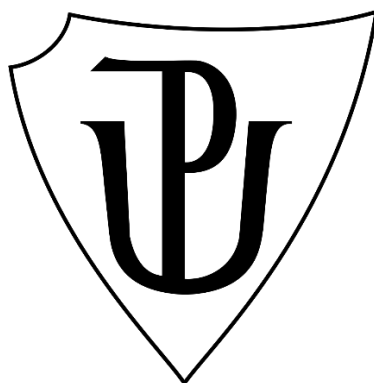


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOTECHNOLOGIÍ



Podiel aktínového cytoskeletu na dynamických procesoch interakcií lucerny (*Medicago sativa* L.) so symbiotickými baktériami rodu *Rhizobium* pri hl'úzkovaní

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michal Benkovský
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2024

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb. o vysokých školách v znení neskorších predpisov. Bol som oboznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Podpis študenta

Pod'akovanie

„Chem sa predovšetkým poďakovať svojmu školiteľovi diplomovej práce prof. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za odbornú pomoc, cenné rady, konzultácie a užitočné pripomienky a celkovú pomoc pri písaní tejto diplomovej práci. Ďalej by som chcel poďakovať celému kolektívu na Katedre biotechnológií, najmä Mgr. Kateřině Hlaváčkové, Ph.D., za pomoc a užitočné rady pri práci v laboratóriu. Taktiež by som sa rád poďakoval i vedúcemu katedry prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnenie využitia vybavenia pri práci v laboratóriu. Práca bola podporená v rámci riešenia Študentskej grantovej súťaže na Univerzite Palackého v Olomouci (projekty č. IGA_PrF_2022_014, IGA_PrF_2023_015 a IGA_PrF_2024_012).“

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora	Bc. Michal Benkovský
Názov práce	Podiel aktínového cytoskeletu na dynamických procesoch interakcií lucerny (<i>Medicago sativa</i> L.) so symbiotickými baktériami rodu <i>Rhizobium</i> pri hľuzkovaní
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Symbiotická fixácia dusíka je komplexný proces zahŕňajúci naviazanie symbiotického vzťahu medzi strukovinami spolu s rhizóbiami. Tieto interakcie sú riadené mnohými signálnymi dráhami, ktoré ovplyvňujú štrukturálne a vývojové procesy. Štúdie na strukovinách naznačili, že aktínový cytoskelet je dôležitou súčasťou koordinácie bunkových procesov počas rhizobiálnej infekcie a tvorby koreňových hľúzok. Cieľom tejto diplomovej práce je sledovanie symbiotických interakcií rastlín *Medicago sativa* s baktériami *Sinorhizobium meliloti* so zameraním na zmeny v organizácii a usporiadaní aktínového cytoskeletu. Medzi kontrolnými a transgénnymi rastlinami bola kvantitatívne vyhodnotená efektivita tvorby infekčných vlákien a tvorba koreňových hľúzok. Mikroskopickými metódami boli u transgénnych línií GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, ktorá má zníženú expresiu *SIMKK* a *SIMK*, pozorované štádia symbiotických interakcií v koreňových vláskoch a v koreňových hľúzkach. Výsledky z mikroskopických analýz naznačujú, že aktínový cytoskelet má dôležitú úlohu pri naviazaní rhizóbií na koreňové vlásky, pri tvorbe infekčného vaku a infekčného vlákna a v mnohých bunkových procesoch vo vývoji koreňových hľuziek.

Kľúčové slová	<i>Medicago sativa</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i> , GFP-FABD2, SIMKK, aktínový cytoskelet, symbióza
---------------	--

Počet strán	103
Počet príloh	6
Jazyk	Slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname Bc. Michal Benkovský

Title Involvement of the actin cytoskeleton in the dynamic interaction between alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Rhizobium* during nodulation

Type of thesis Diploma

Department Department of Biotechnology

Supervisor prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.

The year of presentation 2024

Abstract

Symbiotic nitrogen fixation is a complex process involving the establishment of a symbiotic relationship between legumes and rhizobia. These interactions are controlled by many signaling pathways affecting structural and developmental processes. Studies in legumes have indicated that the actin cytoskeleton is an important component of the coordination of cellular processes during rhizobial infection and nodule formation. The aim of this thesis is to study the symbiotic interactions of *Medicago sativa* plants with *Sinorhizobium meliloti*, focusing on changes in the organization and arrangement of the actin cytoskeleton. Between the control and transgenic plants, the efficiency of the formation of infection threads and the formation of nodule was quantitatively evaluated. The stages of symbiotic interactions in root hairs and in nodules were observed by microscopic methods in the transgenic lines GFP-FABD2 and *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, with a reduced expression of *SIMKK* and *SIMK*. The results from the microscopic analyzes indicate that the actin cytoskeleton has an important role in the correct attachment of rhizobia to root hairs, the formation of infection pockets and infection threads, and many cellular processes during the development of root nodules.

Keywords *Medicago sativa*, *Sinorhizobium meliloti*, GFP-FABD2, SIMKK, actin cytoskeleton, symbiosis

Number of pages 103

Number of appendices 6

Language Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	2
2.1	Lucerna siata (<i>Medicago sativa</i> L.).....	2
2.1.1	Všeobecná charakteristika.....	2
2.1.2	Využitie	2
2.2	Symbiotické interakcie Rhizobií s rastlinami <i>Medicago sativa</i>	3
2.2.1	Všeobecná charakteristika.....	3
2.2.2	Prvotná signalizácia a vzájomné naviazanie partnerov.....	4
2.2.2.1	Flavonoidy ako signálne molekuly pre rhizóbiá a signalizácia Nod faktorov	4
2.2.2.2	Rozpoznanie bakteriálnych signálov.....	4
2.2.2.3	Všeobecná symbiotická signálna dráha a kontrola transkripcie symbiotických génov	5
2.2.3	Rhizobiálna infekcia a tvorba infekčného vlákna	7
2.2.4	Organogenéza koreňových hlúčok a tvorba bakteroidov	9
2.3	Rastlinný cytoskelet	11
2.3.1	Aktínový cytoskelet	11
2.3.2	Rastlinné proteíny viažuce sa s aktínom	12
2.3.3	Vizualizácia aktínového cytoskeletu	13
2.3.4	Rola aktínového cytoskeletu v procese rhizobiálnej symbiózy	15
2.3.4.1	Organizácia aktínového cytoskeletu v bunkách koreňov strukovín....	15
2.3.4.2	Organizácia aktínového cytoskeletu v koreňových bunkách strukovín počas symbiotických interakcií	17
2.4	Moderné neinvazívne techniky mikroskopovania	19
2.4.1	„Light-sheet“ fluorescenčná mikroskopia.....	20
2.4.2	Super-rozlišovacia mikroskopia.....	22
2.5	Transformácia rastlín <i>M. sativa</i>	23
2.5.1	Transformácia prostredníctvom baktérií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
2.5.2	Transformácia metódou „gene-gun“	25
2.5.3	Transformácia metódou elektroporácie.....	25
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
3.1	Materiál	26
3.1.1	Použité chemikálie	26
3.1.1	Použité prístroje	27
3.1.2	Roztoky a média.....	28

3.1.3	Software na spracovanie výsledkov	32
3.1.4	Rastlinný materiál	33
3.1.5	Bakteriálny materiál	33
3.2	Metódy	33
3.2.1	Príprava B5H média	33
3.2.2	Príprava B50 média	34
3.2.3	Príprava MMS média	34
3.2.4	Príprava MS média	35
3.2.5	Príprava pevného Fahræus média bez obsahu dusíka	35
3.2.6	Príprava tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka	35
3.2.7	Príprava LB média	36
3.2.8	Odobranie a povrchová sterilizácia listov z donorových rastlín	36
3.2.9	Regenerácia rastlín procesom somatickej embryogenézy	36
3.2.10	Príprava kultúry <i>S. meliloti</i> zo zásobného roztoku	37
3.2.11	Kokultivácia rastlín <i>M. sativa</i> s baktériami <i>S. meliloti</i>	37
3.2.12	Mikroskopická analýza symbiotických interakcií v koreňových bunkách <i>M. sativa</i>	38
3.2.13	Kvantitatívna analýza distribúcie intenzity fluorescencie	39
3.2.14	Mikroskopická analýza štruktúry aktínového cytoskeletu v koreňových hlúčkach	39
3.2.15	Histochemické značenie živých a mŕtvych buniek v koreňových hlúčkach	40
3.2.16	Štatistická analýza	40
4	VÝSLEDKY	41
4.1	Regenerácia rastlín <i>M. sativa</i> pomocou somatickej embryogenézy	41
4.2	Kokultivácia rastlín <i>M. sativa</i> s baktériami <i>S. meliloti</i>	43
4.3	Kvantitatívne vyhodnotenie efektivity tvorby infekčných vlákien a koreňových hlúčok	46
4.4	Mikroskopická analýza aktínového cytoskeletu v koreňových vláskoch rastlín <i>M. sativa</i>	50
4.5	Mikroskopická dokumentácia symbiotických interakcií rastlín <i>M. sativa</i> so <i>S. meliloti</i>	53
4.5.1	Kvantitatívna analýza distribúcie intenzity fluorescencie GFP-FABD2	63
4.6	Mikroskopická analýza organizácie aktínového cytoskeletu v koreňových hlúčkach rastlín <i>M. sativa</i>	66
4.6.1	Mikroskopické pozorovanie histochemicky značených koreňových hlúčok	79
5	DISKUSIA	82
6	ZÁVER	86

7	ZOZNAM LITERATÚRY	87
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	98
9	PRÍLOHY	103

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Vypracovanie rešerše zameranej na problematiku:

- symbiotických interakcií rastlín lucerny s baktériami *Sinorhizobium meliloti* v procese tvorby koreňových hľúzok, vrátane charakteristiky signálnych, vývojových a štruktúrnych aspektov
- metód transgenózy u rastlín a transformačných techník u lucerny
- metód vizualizácie cytoskeletu u plodín a lucerny so zameraním na aktínový cytoskelet
- moderných neinvazívnych mikroskopických metód

Praktická časť

- Optimalizácia kultivačných podmienok *in vitro* pre regeneráciu, selekciu a úspešný rast transformovaných línií lucerny.
- Príprava bakteriálnych kultúr a kokultivácia baktérií s rastlinami v optimalizovaných podmienkach.
- Fenotypová dokumentácia interakcií rastlín s mikróbmami a vyhodnocovanie efektivity hľúzkovania.
- Sledovanie jednotlivých fáz interakcií v priebehu symbiotického procesu u rastlín lucerny s expresiou fluorescenčného markeru aktínového cytoskeletu a fluorescenčne značených baktérií *Sinorhizobium meliloti* mikroskopickými metódami.
- Kvalitatívna a kvantitatívna analýza získaných údajov so zreteľom na zmeny v štruktúrnej organizácii aktínového cytoskeletu v bunkách zapojených do symbiotického procesu.

1 ÚVOD

Medicago sativa L., je jednou z najviac rozšírených a najvýznamnejších strukovín vo svete patriaca do čeľade bôbovitých (*Fabaceae*). Jej význam v udržateľnom poľnohospodárstve a konvenčnom chove dobytka spočíva najmä v jej mimoriadnych vlastnostiach a v nízkych nákladoch na pestovanie. Dôležitou charakteristikou *M. sativa*, tak ako u iných strukovín, je schopnosť interagovať s pôdnymi symbiotickými baktériami, nazývanými rhizóbia, ktoré sú schopné premieňať atmosférický dusík na aktívnu formu dusíka prístupnú pre rastliny. Symbiotická fixácia dusíka prebieha v špecializovaných koreňových orgánoch, nazývaných koreňové hľúžky, ktorých tvorba vyžaduje koordináciu rhizobiálnej infekcie v koreňových vláskoch s iniciáciou delenia buniek v kôre koreňa. Tieto procesy sú riadené početnými signálnymi molekulami a štrukturálnymi a vývojovými dejmi. V reakcii na rôzne vývojové a vonkajšie stimuly, ako sú aj interakcie so symbiotickými rhizóbiami, sa rastlinný cytoskelet rýchlo mení. Proteíny, ktoré sú spojené s cytoskeletom, kontrolujú tieto dynamické zmeny modifikáciami cytoskeletu na základe signálnej transdukcie pri vnímaní týchto zmien (Radović *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2022; Hlaváčková *et al.*, 2023a).

Rastliny *M. sativa* obohacujú pôdu o biologicky fixovaný dusík čo má ohromný význam v ekologickom poľnohospodárstve. Klasické metódy šľachtenia sú u *M. sativa* zdĺhavé a pokrok pri vylepšení vlastností a odolnosti voči abiotickým a biotickým stresom a zvyšovaní výnosu je pomalý. Preto súčasné transformačné a genetické techniky poskytujú lákavejšiu a výhodnejšiu náhradu. (Radović *et al.*, 2009; Tichá *et al.*, 2020).

Predkladaná diplomová práca sa venuje symbiotickým interakciám medzi transgennými rastlinami *M. sativa* s produkciou fluorescenčného markeru GFP-FABD2 na vizualizáciu aktínového cytoskeletu a baktériami *Sinorhizobium meliloti* s produkciou fluorescenčného markeru mRFP. Súčasťou práce je kultivácia transformovaných rastlín a príprava bakteriálnych kultúr na kokultiváciu s rastlinami. Ďalej bola kvantitatívne vyhodnotená účinnosť tvorby infekčných vlákien a koreňových hľúžok medzi transgennými líniami. Pomocou mikroskopických metód boli pozorované jednotlivé štádiá symbiotického vzťahu a získané údaje boli kvalitatívne a kvantitatívne analyzované vo vzťahu k zmenám v organizácii a usporiadaní aktínového cytoskeletu v bunkách zúčastňujúcich sa symbiotického procesu.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Lucerna siata (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Všeobecná charakteristika

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je trváca kvitnúca rastlina s autotetraploidným genómom ($2n = 4x = 32$), patriaca do čeľadi bôbovitých (*Fabaceae*). Rozsiahla genetická variabilita lucerny umožňuje rast v širokom spektre regiónov a dobrú adaptabilitu na rôzne podmienky prostredia. Má hlboko rastúci koreňový systém, vďaka ktorému dobre odoláva voči suchým podmienkam a vysokým teplotám. V súčasnosti je to najvýznamnejší druh strukovín a jednou z najviac pestovaných krmovín hospodárskych zvierat vo svete (Armstrong, 1954; Michaud *et al.*, 1988; Radović *et al.*, 2009; Annicchiarico *et al.*, 2015). Výskum na lucerne je relatívne náročný, a to hlavne kvôli jej autotetraploidnému genómu a rozmnožovaniu cudzoopelením. Oveľa častejšie sa ako modelová strukovina používa príbuzný samoopelivý, diploidný druh *Medicago truncatula*, s kratším životným cyklom a menším genómom. Avšak tento druh nemá veľkú agronomickú hodnotu (Zhou *et al.*, 2011; Tichá *et al.*, 2020). Použitie biotechnologických postupov na zlepšenie mnohých vlastností lucerny, ako je napríklad zlepšený výnos, môže urýchliť výskum v porovnaní s tradičným šľachtením (Singer *et al.*, 2018).

2.1.2 Využitie

Rozličné fyziologické a morfológické vlastnosti lucerny, ktoré prispievajú k jej stabilnej a veľkej úrode, podporujú jej agronomický a environmentálny význam. Lucerna sa uprednostňuje pred ostatnými krmovinami pre jej vysokú nutričnú hodnotu. Je dobre stráviteľná a obsahuje veľké množstvo rozpustných bielkovín, vitamíny A, C, E a K, minerály, a taktiež široké spektrum chemických zlúčenín s fytofarmakologickým potenciálom. Najčastejšia podávaná forma lucerny na kŕmenie dobytká je seno, ale taktiež je používaná aj vo forme senáže, siláže, brikiet a pastvín (Radović *et al.*, 2009; Bora a Sharma, 2010). Má vynikajúcu úlohu pri predchádzaní vodnej a veternej erózie pôdy a vyžaduje menej aplikácií pesticídov a herbicídov (Karlen *et al.*, 2007; Annicchiarico *et al.*, 2015). Lucerna, podobne ako iné druhy strukovín, sa môže prispôbiť nedostatku dusíka naviazaním symbiotických vzťahov s pôdnymi rhizobiálnymi baktériami, ktoré

dokážu premeniť atmosférický dusík (N_2) na amoniak (NH_3). Počas pestovania lucerny je biologicky fixovaný dusík ukladaný do podzemných orgánov a po rozpadnutí fytoomasy je dostupný pre nasledujúce plodiny. Kvôli tejto vlastnosti nie je na poliach potrebné používanie dusíkatých hnojív, ktoré sú drahé a nebezpečné. Priemerne lucerna fixuje 200 kg dusíka na hektár ročne, čo je oveľa väčšie množstvo oproti väčšine strukovín. Polia so striedaním plodín, ktoré zahŕňajú pestovanie lucerny, majú lepšiu úrodnosť pôdy a taktiež zvýšené výnosy plodín v nasledujúcich rokoch (Radović *et al.*, 2009; Sutton *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2020). Lucerna má taktiež potenciál byť využívaná ako dvojúčelová plodina, pričom listy by sa mohli použiť ako krmivo s vysokým obsahom bielkovín a stonky by mohli byť spracované na výrobu bioetanolu fermentáciou alebo na výrobu elektriny spaľovaním (DeLong *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2007).

2.2 Symbiotické interakcie Rhizobií s rastlinami *Medicago sativa*

2.2.1 Všeobecná charakteristika

Strukoviny (*Fabaceae*) sú dôležité druhy plodín pre poľnohospodársky využívané a prírodné ekosystémy, pretože majú prirodzenú schopnosť obohatovať pôdu o fixovaný dusík. Môžu prosperovať v pôdach bez minerálneho a organického dusíka vďaka vzťahom s pôdnymi baktériami, nazývanými rhizóbia (hlavne rodu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, a *Sinorhizobium*). Sú to gram-negatívne baktérie patriace do kmeňa *Proteobacteria*, schopné transformovať pre rastliny nedostupný atmosférický dusík (N_2) na fyziologicky aktívnu formu dusíka, amoniak (NH_3), ktorý je prístupný rastlinám. Vďaka symbióze strukovín a rhizobií sa vytvárajú koreňové hľúzky, v ktorých je ideálne prostredie na fixáciu dusíka. Pochopenie týchto komplexných mechanizmov medzi strukovinami a kompatibilnými rhizóbiami, ako sú signálne procesy vedúce k naviazaniu baktérie, zakrútenie koreňového vlásku, tvorba infekčného vlákna (IT) a spustenie procesu tvorby koreňových hľúzok, je dôležité na zvýšenie produktivity strukovín (Roy *et al.*, 2020; Hlaváčková *et al.*, 2023a; Shumilina *et al.*, 2023).

2.2.2 Prvotná signalizácia a vzájomné naviazanie partnerov

2.2.2.1 Flavonoidy ako signálne molekuly pre rhizóbiá a signalizácia

Nod faktorov

V pôdach s obmedzeným obsahom dusíka strukoviny zvyčajne vylučujú skupinu zlúčenín nazývaných flavonoidy, ktoré sú dôležité pri začiatku interakcie medzi strukovinami a rhizóbiami. Flavonoidy sú nízkomolekulárne sekundárne metabolity biosyntetizované fenylypropanoidovou cestou, pôsobiace ako chemotaktické signály pre rhizóbiá. Iniciujú tak ich migráciu smerom ku koreňom hostiteľa (Subramanian *et al.*, 2007; Liu a Murray, 2016). Prostredníctvom špecifických enzýmov fenylypropanoidovej cesty, strukoviny produkujú isoflavonoidy. Pre každý druh strukovín len niektoré konkrétne flavonoidy majú úlohu v indukcii rhizóbiálnych nodulačných (*NOD*) génov (Wang, 2011; Liu a Murray, 2016).

Vylúčené flavonoidy sú rozpoznané baktériami pomocou nodulačných proteínov D (NodD), ktoré slúžia ako transkripčné regulátory. Tie sa podieľajú na regulácii transkripcie rhizóbiálnych *NOD* génov, ktoré vedú k syntéze a uvoľňovaniu lipochitooligosacharidov (LCOs), nazývanými Nod faktory (NFs) (Lerouge *et al.*, 1990; van Rhijn a Vanderleyden, 1995; Perret *et al.*, 2000). Ich štruktúra pozostáva z β -1,4-N-acetyl-D-glukozamínových zvyškov, v ktorých rôzne molekuly modifikujú redukujúci koniec, zatiaľ čo neredukujúci koniec oligosacharidu je N-acylovaný. Modifikácie hlavného reťazca, počet glukozamínových zvyškov a dĺžka acylovaného reťazca sa medzi rôznymi rhizóbiálnymi druhmi líšia a tým prispievajú k ich špecifite (Dénarié *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000). Indukcia deformácie koreňových vlások, vývoj infekčných vlákien, a proliferácia buniek kôry koreňa sú funkčnými vplyvmi Nod faktorov (Oldroyd *et al.*, 2011).

2.2.2.2 Rozpoznanie bakteriálnych signálov

Pomocou štúdií na rastlinných mutantoch, ktoré nie sú schopné vnímať Nod faktory, boli identifikované v rôznych druhoch strukovín LysM receptorové kinázy (LysM-RLKs) nazývané Nod faktor receptory (NF receptory; Kouchi *et al.*, 2010). U *M. truncatula* boli objavené receptory NFP (Arrighi *et al.*, 2006) a LYK3 (Limpens *et al.*, 2003), u *Lotus japonicus* a u *Glycine max* receptory NFR1 a NFR5 (Madsen *et al.* 2003, Radutoiu *et al.*, 2003; Indrasumunar *et al.*, 2011), a u *Pisum sativum* receptory SYM37 and SYM10

(Zhukov *et al.*, 2008). LysM-receptorová doména, ktorá rozpoznáva Nod faktory, je lokalizovaná v extracelulárnom priestore a je prepojená transmembránovou doménou ku intracelulárnej kinázovej doméne. V *M. truncatula* NFP receptor zohráva kritickú rolu v naviazaní NFs zo *Sinorhizobium meliloti*. Mutanty *nfp* sú úplne necitlivé na NFs a nedochádza u nich k indukcii deformácie koreňových vláskov a k transmembránovym osciláciám v koncentrácii vápenatých iónov (Ca^{2+} ; Amor *et al.*, 2003 Arrighi *et al.*, 2006). U mutantov *lyk3* avšak v reakcii na *S. meliloti* a NFs nastáva deformácia koreňových vláskov a dochádza u nich k osciláciám v koncentrácii Ca^{2+} , ale nevytvárajú infekčné vlákna. Predpokladá sa teda, že NFP je potrebný na zvýšenie koncentrácie vápnika a génovú expresiu a LYK3 je dôležitý na vstup baktérií do koreňových vláskov (Limpens *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007).

2.2.2.3 Všeobecná symbiotická signálna dráha a kontrola transkripcie symbiotických génov

Po špecifickom rozpoznaní Nod faktorov receptormi dochádza k aktivácii signalizačnej kaskády nazývanej všeobecná symbiotická signálna dráha (z angl. CSSP). Niektoré gény potrebné pre rhizobiálnu symbiózu sú taktiež zodpovedné za interakcie s arbuskulárnymi mykoríznyimi hubami (Kouchi *et al.*, 2010). CSSP začína po rozpoznaní NFs depolarizáciou plazmatickej membrány a následnej oscilácii v koncentrácii Ca^{2+} v jadrách buniek koreňových vláskov. Tieto zmeny v koncentráciách Ca^{2+} sú indukované cez LRR-receptorovú kinázu (LRR-RLKs), čo je SymRK v *L. japonicus*, DMI2 v *M. truncatula*, a NORK v *M. sativa* (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Charpentier a Oldroyd, 2013). SymRK/DMI2/NORK sú lokalizované na plazmatickej membráne buniek, a predpokladá sa, že tvoria heteroméry s NFR5/NFP receptormi (Limpens *et al.*, 2005; Antolín-Llovera *et al.*, 2014). Medzi signálne komponenty LRR-RLKs patrí negatívny regulátor nodulácie MtPUB1, čo je E3 ubikvitín ligáza, ktorá je fosforylovaná prostredníctvom DMI2 a receptorom LYK3 (Vernié *et al.*, 2016). Krátko po rhizobiálnej infekcii sa mitogénom aktivované proteínkinázy (MAPKs) v rámci tejto komplexnej symbiotickej signálnej dráhy aktivujú. Súčasťou MAPK kaskády sú 3 proteínkinázy, MAPK kináza kináza (MAPKKK), MAPK kináza (MAPKK) a MAPK, ktoré fungujú sekvenčne na prenos signálu počas mnohých bunkových a vývojových procesov a v reakciách na biotický a abiotický stres (Lopez-Gomez *et al.*, 2012; Zhang a Zhang, 2022). SymRK-interagujúci proteín (LjSIP2), ktorý reprezentuje mitogénom aktivovanú proteínkinázu kinázu (MAPKK), má pravdepodobne zásadnú úlohu v skorej signalizácii

symbiocy a organogenéze koreňových hl'úzok (Chen *et al.*, 2012). U *M. sativa* nadexpresia stresom indukovanej mitogénom aktivovanej proteínkinázy (SIMK) podporila rast koreňových vláskov, tvorbu infekčných vláskien a zhlukovanie koreňových hl'úzok (Hrbáčková *et al.*, 2021). Predpokladá sa, že enzým 3-hydroxy-3-metylglutaryl CoA reduktáza 1 (HMGR1), podieľajúci sa na syntéze signálnych izoprenoidných zlúčenín mevalonátovej dráhy má dôležitú úlohu počas symbiotickej signalizácie a v diferenciácii koreňových hl'úzok. Tento enzým interaguje s DMI2 a jeho znížená expresia vedie k poklesu tvorby koreňových hl'úzok (Kevei *et al.*, 2007).

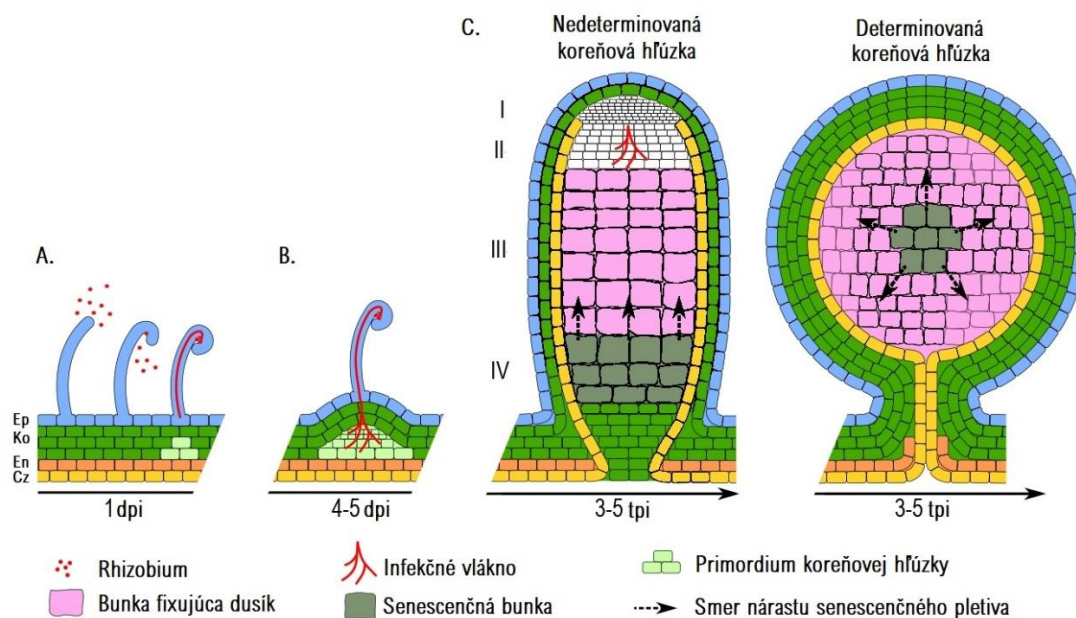
Pomocou štúdií na mutantoch defektných v osciláciách koncentrácií vápnika sa podarilo nájsť rôzne proteíny, ktoré pomáhajú vytvárať tento signál. Za oscilácie v koncentráciách Ca^{2+} je zodpovedný iónový kanál prepúšťajúci draslík MtDMI1, vápnikový kanál MtCNGC15 a ich homológy LjCASTOR a LjPOLLUX (Ané *et al.*, 2004; Charpentier *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2019). Predpokladá sa, že iónové kanály DMI1 a CNGC15 sú v jednom komplexe na jadrovom obale, čo môže vysvetlovať ich synchronnú aktiváciu a moduláciu Ca^{2+} signálu (Charpentier *et al.*, 2016). Dôležitú úlohu v prenose signálov do jadra majú taktiež komponenty jadrového póru, vrátane nukleoporínov NUP133 a NUP85 a proteínu NENA (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2010). Oscilácie v koncentráciách Ca^{2+} v jadre vyvolané iónovými kanálmi aktivujú Ca^{2+} -kalmodulín dependentnú proteínkinázu (CCaMK) v *L. japonicus* a DMI3 v *M. truncatula*, ktoré sú dôležité na indukciu jadrových transkripčných regulátorov nevyhnutných na kontrolovanie expresie génov spojených s rhizobiálnou infekciou (Singh a Parniske, 2012; Fonouni-Farde *et al.*, 2016). LjCCaMK/MtDMI3 fosforyluje transkripčný aktivátor LjCYCLOPS/MtIPD3, ktorý reguluje génovú expresiu nodulačných génov (Singh *et al.*, 2014). Medzi transkripčné faktory, ktoré interagujú s CCaMK/CYCLOPS (DMI3/IPD3) a tvoria transkripčný aktivačný komplex, patria NSP1, NSP2 a DELLA proteíny (Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005; Fonouni-Farde *et al.*, 2016). Po fosforylácii LjCYCLOPS/MtIPD3 sa aktivuje expresia symbiotického génu *NIN* dôležitého v procese iniciácie tvorby infekčného vlákna a organogenézy koreňových hl'úzok. Transkripčný faktor *NIN* spúšťa tvorbu infekčného vlákna expresiou LjNPL proteínu, potrebného na degradáciu bunkových stien buniek počas infekcie, a podjednotky A-1 jadrového transkripčného faktora Y (MtNF-YA1, Xie *et al.*, 2012; Laporte *et al.*, 2014). MtNF-YA1 je tiež kritický v génovej expresii pre iniciáciu hl'úzkového meristému a tvorbu koreňových hl'úzok (Laporte *et al.*, 2014). Ďalšími dôležitými transkripčnými faktormi u *M. truncatula* sú ERN1 a homológny ERN2, ktoré

zohrávajú dôležitú úlohu v rhizobiálnej infekcii a organogenéze koreňových hlúčok. ERN1 a ERN2 sa viažu a aktivujú transkripciu *ENOD11* a *ENOD12*, ktoré sú potrebné pre tvorbu IT. Transkripčný faktor NIN pôsobí v epiderme koreňa ako antagonista *ERN1* a tým negatívne reguluje transkripciu *ENOD11*, čím kontroluje rozsah rhizobiálnej infekcie (Andriankaja *et al.*, 2007; Cerri *et al.*, 2012; Vernié *et al.*, 2015; Cerri *et al.*, 2016).

2.2.3 Rhizobiálna infekcia a tvorba infekčného vlákna

Rozpoznanie NF a prichytenie rhizóbií na koreňové vlásky a epidermu koreňa je prvým priamym krokom v spojení rhizóbií s rastlinným hostiteľom. Následne sú zachytené pomocou zakrútenia koreňových vláskov v takzvaných infekčných váčkoch, v ktorých sa rhizóbie delia. K infekcii koreňov strukovín rhizóbiami dochádza najčastejšie cez tubulárnu štruktúru rastúcu v koreňových vláskoch, nazývanú infekčné vlákno (IT, Obr. 1A). Rhizóbia sú schopné taktiež infikovať strukoviny intercelulárnou cestou cez trhliny na povrchu koreňa (Roy *et al.*, 2020). Okrem Nod faktorov sú bakteriálne exopolysacharidy (EPS) taktiež nevyhnutné pre rhizobiálnu infekciu. Pri symbióze medzi *M. sativa* a *S. meliloti*, je produkovaný sukcinoglykán, ktorý je nevyhnutný pre iniciáciu a predlžovanie IT a jeho zvýšená syntéza zvyšuje kapacitu hlúčkovania (Cheng a Walker, 1998; Jones, 2012). Na vstup rhizóbií do koreňového vlásku je potrebná degradácia bunkovej steny enzýmami, po ktorej dochádza k invaginácii IT membrány do vnútra bunky (Suzaki *et al.*, 2015). K tomuto procesu prispievajú membránové proteíny, vrátane MtFLOT2, MtFLOT4, a MtSYMREM1. Predpokladá sa, že flotilíny spolupracujú pri invaginácii IT do koreňových vláskov a MtFLOT4 má spolu s MtSYMREM1 dôležitú úlohu v predlžovaní IT cez koreňový vlások (Haney a Long, 2010; Lefebvre *et al.*, 2010). Premiestňovanie jadra, reorganizácia mikrotubulov a aktínového cytoskeletu reguluje vývoj a orientáciu IT. Podobne ako cytoplazmatické vlákna vytvárajúce sa cez vakuolu počas delenia vakuolizovaných buniek, predinfekčné vlákna, tiež známe ako cytoplazmatické mostíky, slúžia na prerastanie IT cez epidermálnu bunku a cez bunky primárnej kôry koreňa (van Brussel *et al.*, 1992; Gage, 2004). Predpokladá sa, že na špičke IT sa nachádza exocyst komplex, nazývaný „infektozóm“, ktorý zaručuje polárny rast IT smerom do buniek kôry koreňa v mieste vznikajúcej koreňovej hlúčky. Jeho súčasťou je symbiotický proteín MtVPY, podjednotka exocystového komplexu MtEXO70 H4 a MtLIN (Murray, 2011; Liu *et al.*, 2019). Aby sa rhizóbiá dostali k primordiu koreňovej hlúčky, musia opakovane prechádzať cez bunkové steny a

cytoplazmatické membrány buniek koreňa. SyPME1 a NPL priestorovo sprostredkovávajú modifikácie pektínu, ktoré vedú k vytvoreniu apoplastického kompartmentu a k úspešnému intracelulárnemu postupu IT (Su *et al.*, 2023). K tvorbe primordia koreňovej hľúzky bunecným delením v primárnej kôre dochádza zároveň s včasnou infekciou koreňových vláskov (van Brussel *et al.*, 1992; Timmers *et al.*, 1999).



Obrázok 1. Schematické znázornenie vzniku a vývoja symbiôzy medzi rhizobiami a strukovinou. A - Prichytenie rhizóbií na koreňové vlásky a tvorba infekčného vlákna. B – Tvorba primordia koreňovej hľúzky. C - štruktúra zrelých nedeterminovaných a determinovaných koreňových hľúzok. Ep - epidermis En - endoderma; Ko – koreňová kôra; Cz - cievy vzäzok; dpi - deň po inokulácii; tpi - týždeň po inokulácii. Upravené podľa Kazmierczak *et al.* (2020).

2.2.4 Organogenéza koreňových hlúčok a tvorba bakteroidov

Koreňové hlúčky sú klasifikované buď ako determinované alebo nedeterminované (Obr. 1C). Strukoviny ako *M. sativa*, *M. truncatula*, *P. sativum* a *Vicia sativa* vytvárajú predĺžené nedeterminované koreňové hlúčky rastúce z perzistentného hlúčkového meristému, zatiaľ čo väčšinou guľaté determinované koreňové hlúčky, ako u druhoch *L. japonicus*, *Glycine max* a *Phaseolus vulgaris*, sú tvorené prechodne aktívnymi meristémami. Produkcia primordia koreňových hlúčok a vaskularizácia sa spúšťajú po rozpoznaní Nod faktorov delením buniek koreňového pericyklu a koreňovej kôry. I keď nedeterminované aj determinované hlúčky vyžadujú na organogenézu začiatok bunkového delenia v pericykle, determinované hlúčky pochádzajú zo strednej a vonkajšej koreňovej kôry, zatiaľ čo nedeterminované hlúčky pochádzajú z vnútornej koreňovej kôry (Obr. 1 B, C; Hadri *et al.*, 1998; Maunoury *et al.*, 2008; Oldroyd *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2013). Pomer auxínov a cytokinínov a ich koncentrácia ovplyvňuje delenie buniek a ich diferenciáciu počas organogenézy koreňovej hlúčky. Cytokinínový receptor MtCRE1 je primárnym receptorom pre cytokiníny, ktoré kontrolujú bunkové delenie a vedú k vytvoreniu primordia koreňovej hlúčky. Inhibícia polárneho transportu auxínu je nevyhnutná pre vývoj nedeterminovaných koreňových hlúčok, ale nie pre vývoj determinovaných koreňových hlúčok, aj keď gény auxínovej odpovede sú stimulované v mieste začiatku oboch typov hlúčok (Oldroyd *et al.*, 2011; Ng a Mathesius, 2018).

Keď sa IT dostane k primárnej kôre vyvíjajúcej sa koreňovej hlúčky, začne sa rozvetvovať a uvoľňovať rhizóbiu pomocou sekrečnej/exocytotickej dráhy, ktorá doručuje membránové vezikuly, nazývané infekčné kvapôčky, do plazmatickej membrány. Tieto infekčné kvapôčky sa počas exocytózy zlúčia s membránou bunky pomocou dvoch foriem komplexov v-SNAREs a t-SNAREs (Ivanov *et al.*, 2012). Uvoľňovaním rhizóbií do buniek vzniká organela nazývaná symbiozóm. Predpokladá sa, že endocytotická dráha tiež zohráva rolu pri uvoľňovaní baktérii do hostiteľských buniek a pri tvorbe symbiozómov, a to pomocou dvoch endocytotických proteínov MtFLOT2/4 a MtSYMREM1, nájdených v membráne symbiozómov (Haney a Long, 2010; Lefebvre *et al.*, 2010). Delením a diferenciáciou rhizóbií v infikovaných bunkách koreňovej hlúčky vznikajú tisíce symbiozómov, v ktorých každý nesie jeden alebo viac bakteroidov (Roth a Stacey, 1989). Bakteroidy katalyzujú redukciu atmosférického dusíka na amoniak pomocou enzýmu nitrogenáza, čo je proces bežne označovaný ako „symbiotická fixácia dusíka“. Amoniak je následne asimilovaný do rastliny premenením na glutamín

a glutamát výmenou za redukovaný C pochádzajúci z fotosyntézy rastlín. Tento proces je energeticky náročný, pričom sa spotrebuje veľké množstvo ATP (Ferguson *et al.*, 2010; Udvardi a Poole, 2013). Možnej inhibícii nitrogeňazy kyslíkom sa predchádza poklesom koncentrácie voľného kyslíka v infikovaných bunkách pomocou leghemoglobínu, ktorý viaže a transportuje kyslík (Ott *et al.*, 2005).

Nedeterminované koreňové hľúžky rastú ako výsledok expanzie infikovaných buniek a prebiehajúcej bunkovej proliferácie. Kôra koreňovej hľúžky obklopuje centrálnu pletivá a obsahuje cievne zväzky, ktoré sú prepojené s cievnymi zväzkami koreňa. Centrálna pletivá sa v dôsledku vývoja nedeterminovaných koreňových hľúžok dá rozdeliť do viacerých zón. Distálna časť primordia a hľúžky udržiava aktivitu bunkového delenia a vytvára apikálny meristém (zóna I), ktorý má konštantnú veľkosť a je aktívny počas celej životnosti koreňovej hľúžky. V infekčnej zóne (II) sú novo vytvorené bunky infikované pomocou IT, ktoré sa po infekcii začnú diferencovať. Iba bunky, ktoré sú schopné endoreduplikácie, sú infikované rhizóbiami. Endoreduplikácia produkuje polyploidné bunky so zvýšeným počtom kópií každého chromozómu zahrnutím jedného alebo viacerých kôl replikácie DNA bez mitózy. Zóna fixácie dusíka (III) obsahuje zväčšené infikované bunky s diferencovanými bakteroidmi fixujúce N₂. V senescentnej zóne (IV) staršie fixujúce bunky strácajú aktivitu a organely spolu s bakteroidmi degradujú (Hadri *et al.*, 1998; Manouri *et al.*, 2007).

Posledná fáza existencie a rastu koreňovej hľúžky počas symbiôzy s rhizóbiami sa nazýva senescencia. Je to biochemicky riadený proces, ktorý umožňuje recykláciu živín a môže byť vyvolaný v dôsledku prirodzeného starnutia ale aj environmentálnymi podnetmi, ako je sucho a vysoká hladina dusičnanov. Senescencia je najprv v dôsledku degradácie leghemoglobulínu sprevádzaná zmenami farby koreňovej hľúžky, ktorá sa mení z ružovej na zelenú. Počas senescencie dochádza k degradácii symbiozomálnej membrány, čím vznikajú početné vezikuly v cytosole infikovaných buniek. Vo finálnej fáze senescencie dochádza k degradácii bakteroidov a k úmrtiu buniek koreňovej hľúžky. Senescencia je normálne sprostredkovaná transkripčnými faktormi a zahŕňa tvorbu lipáz a proteáz rozkladajúce lipidy a proteíny, ako aj transportéry, ktoré exportujú využiteľné makromolekuly (Van de Velde *et al.*, 2006; Kazmierczak *et al.*, 2020; Shumilina *et al.*, 2023).

2.3 Rastlinný cytoskelet

Rastlinné bunky obsahujú komplexnú, vysoko dynamickú trojrozmernú sieť tvorenú z aktínových vlákien, mikrotubulov a asociovaných proteínov, ktorá sa spoločne označuje ako cytoskelet. Tieto štruktúry sa môžu rýchle zmenšovať, fragmentovať, rásť a prepájať medzi sebou do siete alebo zväzkov rôznej polariry reakciou na rôzne vývojové podnety, abiotické a biotické signály. Rastlinný cytoskelet zohráva dôležitú úlohu v mnohých bunkových procesoch. Počas cytoplazmatického prúdenia sa rastlinné organely pohybujú pozdĺž aktínových filamentov pomocou motorových proteínov myosínov (Wasteneys a Galway, 2003; Schmidt a Panstruga, 2007; Peremyslov, 2008). Aktínový cytoskelet je ďalej nevyhnutný pri tvorbe plazmatickej platničky počas cytokinézy, separácii dcérskych buniek počas bunkového delenia (Valster *et al.*, 2007), modulácii otvárania prieduchov (Hwang *et al.*, 1997), transdukcii gravitropických signálov v koreňových bunkách (Braun *et al.*, 2004), pri raste koreňa (Baluška *et al.*, 2000), a pravdepodobne pri medzibunkovej komunikácii prostredníctvom plazmodesmat (Diao *et al.*, 2018). Mikrotubuly majú dôležitú úlohu pri biosyntéze primárnej bunkovej steny, transporte vezikúl, v určení tvaru bunky (Paradez *et al.*, 2006), počas celého bunkového cyklu rastliny ako je determinácia roviny bunkového delenia, segregácia chromozómov, a tvorba plazmatickej platničky počas cytokinézy (Vantard *et al.*, 2000). Keď rastlinné bunky prídu do kontaktu so symbiotickými organizmami ale aj patogénmi, spôsobí to rýchle zmeny v usporiadaní cytoskeletu. Zatiaľ čo prestavba cytoskeletu je u rastlín spojená s obrannými reakciami pri interakciách s patogénom, pri symbiotických interakciách je reorganizácia cytoskeletu dôležitá pre vytvorenie úspešného vzťahu (Schmidt a Panstruga, 2007).

2.3.1 Aktínový cytoskelet

Aktín je vysoko konzervovaný a najhojnejší proteín vo väčšine eukaryotických buniek a vykonáva širokú škálu funkcií. Aktínové monoméry sú globulárne proteíny (nazývané taktiež G-aktín) približne o veľkosti 42 kDa, ktoré obsahujú pevne spojenú molekulu ATP alebo ADP. Tieto podjednotky polymerizujú do dlhých vlákien nazývaných filamentóznym aktínom (F-aktín). Dve paralelné aktínové vlákna vytvárajú pravotočivú dvojzávitnicu s priemerom okolo 8 nm, nazývané mikrofilamenty, ktoré obsahujú 13–14 podjednotiek G-aktínu na pol otáčky. Proces vytvárania nového vlákna (nukleácia) a jeho predlžovania, je možný po stabilizovaní podjednotiek zostavených v počiatočnom agregáte. Aktínové

filamenty majú štruktúrne odlišné konce, pretože ich asymetrické aktínové monoméry smerujú rovnakým smerom. Pridávanie a odstraňovanie aktínových monomérov je na týchto koncoch odlišné. Rýchlo rastúci plus (+) koniec, taktiež označovaný ako ostnatý („barbed“) a pomaly rastúci mínus koniec (-), nazývaný taktiež ako špicatý („pointed“) fungujú ako miesta pre rast a skracovanie vlákna v rovnovážnom stave. Jedným z primárnych mechanizmov kontrolujúcich zmenu medzi G-aktínom a F-aktínom je hydrolýza ATP vo vnútri vlákna a následne odštiepenie fosfátovej skupiny z podjednotky. Aktínové filamenty môžu byť tým pádom v dvoch stavoch. Filament v T-konformácii má v podjednotkách naviazané ATP, ktorý po hydrolýze na ADP zostáva vo vnútri filamentu a vzniká tým D konformácia. V porovnaní s filamentom v D-forme, je T-forma viažuca ATP stabilnejšia. V rovnovážnej koncentrácii aktínových podjednotiek sa aktínové monoméry s ATP pripájajú na rýchlo sa predlžujúci plus koniec vlákna, pričom aktínové monoméry s ADP súčasne disociujú z mínus konca. Pri týchto podmienkach je rast vlákna na plus konci a zmršťovanie vlákna na mínus konci v rovnováhe (Staiger *et al.*, 2000; Dominguez a Holmes, 2011; Alberts *et al.*, 2015).

2.3.2 Rastlinné proteíny viažuce sa s aktínom

Dynamika a organizácia aktínového cytoskeletu je regulovaná mnohými aktín-viažucimi proteínmi (ABPs). Konkrétnejšie, tieto polypeptidy riadia rozvetvenie, stabilizáciu a usporiadanie aktínových filamentov, rýchlosť a smer polymerizácie a proces nukleácie filamentov. Jeden z najviac zastúpených (abundantných) proteínov z tejto skupiny je profilin, proteín viažuci sa na aktínové monoméry, ktorý zohráva dôležitú rolu pri zostavovaní aktínových filamentov. Väzbou na monoméry G-aktínu katalyzuje výmenu ADP za ATP vo väzobnom mieste a zároveň inhibuje nukleáciu a hydrolýzu ATP, čím ich udržuje v stave s vysokou afinitou ku plus koncu vlákna. Aktínové monoméry naviazané s profilinom sú schopné sa zúčastniť elongácie iba na plus konci filamentu. Vďaka svojej väčšej afinite k aktínu, profilín súťaží s ďalšími aktín-viažucimi proteínmi o väzbu na jednotlivé aktínové monoméry. Na polymerizáciu aktínu, okrem proteínov ovplyvňujúce dostupnosť aktínových monomérov, sú dôležité aktín-nukleačné proteíny, ku ktorým patrí Arp2/3 komplex a formíny. Tvorba nového aktínového vlákna je iniciovaná komplexom Arp2/3 od mínusového konca, čo umožňuje rýchle predĺženie na plusovom konci. Arp2/3 komplex je jediný nukleačný proteín tvoriaci rozvetvené aktínové vlákna. Formíny vytvárajú nerozvetvené aktínové filamenty a zostávajú spojené

s rastúcim plusovým koncom vlákna, čím poskytujú ochranu proti tzv. „capping“ proteínom (CP). CP sa pevne viažu na plus konce aktínových filamentov, čím účinne zabráňujú ich elongácii alebo depolymerizácii (Dominguez a Holmes, 2011; Alberts *et al.*, 2015).

Ďalšia dôležitá skupina proteínov sú aktín-oddeľujúce proteíny („actin-severing proteins“), ku ktorým patrí rodina aktín-depolymerizujúcich faktorov (ADFs)/kofilínov. ADFs/kofilíny môžu zmeniť dynamiku aktínu a sprostredkovať depolymerizáciu aktínu väzbou na G-aktín alebo F-aktín. ADFs/kofilíny sa viažu na ADP-aktín s väčšou afinitou než ATP-aktín, čím majú tendenciu sa viazať na staršie filamenty v bunke. Po naviazaní sa aktínový filament začne tesnejšie skrúcať, čo spôsobuje jeho pretrhnutie na kratšie fragmenty a zvýšenú disociáciu G-aktínu od mínusových koncov (Dos Remedios *et al.*, 2003; Drøbak *et al.*, 2004; Dominguez a Holmes, 2011; Alberts *et al.*, 2015). Ďalšou dôležitou skupinou proteínov je vilín/gelsolin/fragmín superrodina proteínov závislá od Ca^{2+} , ktoré má všestranné funkcie v dynamike aktínových filamentov. Vilíny sú nevyhnutné pre zosieťovanie aktínových filamentov. U *Arabidopsis thaliana* bolo identifikovaných 5 foriem vilínov, ktoré okrem zosieťovania sú schopné nukleácie, oddeľovania aktínových filamentov a stabilizovania plus konca v závislosti od koncentrácie Ca^{2+} (Su *et al.*, 2007; Khurana *et al.*, 2010; van der Honing *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2023). K dôležitým aktín-zosieťujúcim proteínom patria taktiež fimbríny, ktoré sú schopné zosieťovať aktínové filamenty do štruktúr vysokého rádu. Okrem toho je cytoplazmatické prúdenie uľahčené silnými zväzkami mikrofilamentov, ktoré sú tvorené zosieťovaním závislým od fimbrínu (Alberts *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2023).

2.3.3 Vizualizácia aktínového cytoskeletu

Zobrazovanie aktínových štruktúr bez zasahovania do procesu polymerizácie a depolymerizácie aktínu, ktoré umožňujú dynamiku aktínu v bunkách, je nevyhnutné pre výskum aktínového cytoskeletu a funkcií súvisiacich s aktínom. Vizualizácia špecifických aktínových štruktúr a s nimi spojených úloh bola a zostáva problémom, a to najmä v živých bunkách, a v reálnom čase. V dôsledku toho sa v priebehu rokov vytvorila a vylepšila široká škála metód a sond na sledovanie dynamiky aktínových filamentov v rôznych modelových organizmoch (Melak *et al.*, 2017).

Štúdie na zobrazovanie F-aktínu v rastlinných bunkách boli prevažne závislé od chemicky fixovaných rastlinných vzoriek, ktoré boli označené pomocou

imunofluorescenčného značenia alebo fluorescenčne značeným faloidínom. Imunolokalizačné techniky používajú fluorescenčne značené protilátky, ktoré sa viažu na fixované aktínové štruktúry. Faloidín patrí do skupiny falotoxínov pochádzajúcich z *Amanita phalloides*, ktoré sa viažu na F-aktín s vysokou afinitou. Medzi používané fluorescenčné farby konjugované s faloidínom patrí napr. rodamín a fluoresceín izotiokyanát (FITC). Immunocytochémia spolu s fluorescenčne značeným faloidínom má svoje výhody a stále patrí k využívaným metódam na vizualizáciu aktínového cytoskeletu v rastlinných pletivách. Nevýhodou protilátok oproti faloidínu je, že značia okrem F-aktínu aj G-aktín, čo spôsobuje vysoký šum na pozadí počas snímania (Lazarides a Weber, 1974; Wulf *et al.*, 1979; Melak *et al.*, 2017). Protokoly chemickej fixácie musia byť častokrát prispôbené a optimalizované, pretože môžu viesť k artefaktom a chybnnej interpretácii výsledkov. Na rozdiel od mikrotubulov môže byť náročné zachovať rastlinný aktínový cytoskelet prostredníctvom konvenčných metód chemickej fixácie. Značenie aktínu faloidínom nie je vhodné po chemickej fixácii metanolom, pretože poškodzuje prirodzenú konformáciu F-aktínu a spôsobuje označenie artefaktov. Faloidín taktiež nefarbí vláknitý aktín vo vzorkách, ktoré prešli rýchlou fixáciou zmrazením. Jeho pripájanie k F-aktínu je možné iba v prítomnosti najmenej siedmich aktínových monomérov, čo bráni faloidínu označovať krátke F-aktínové polyméry (Vitha *et al.*, 2000; Ketelaar a Emons, 2009; Pasternak *et al.*, 2015; Kristó *et al.*, 2016; Melak *et al.*, 2017).

Na pochopenie a štúdium mnohých dejov, súvisiacich s dynamickou reorganizáciou aktínového cytoskeletu, je zobrazovanie živých buniek dôležitým experimentálnym postupom. Popísaných bolo niekoľko metód na mikroskopické zobrazenie aktínového cytoskeletu v živých bunkách. Jednou z nich je mikroinjekcia fluorescenčne značeným faloidínom. Hoci táto metóda v živých rastlinných bunkách priniesla nový pohľad na dynamiku aktínového cytoskeletu *in vivo*, nie je to veľmi efektívna technika, pretože môže stabilizovať dynamiku aktínu, je toxická pre bunky, časovo náročná, a nie je aplikovateľná pre väčšinu typov buniek (Sheahan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Ketelaar a Emons, 2009). Najvýznamnejšími fluorofórmami pre zobrazenie špecifických rastlinných proteínov a štruktúr je dnes zelený fluorescenčný proteín (GFP) a jeho homológy a deriváty. Objavenie GFP z medúzy *Aequorea victoria* a vývoj nových fluorescenčných fúzných proteínov výrazne pomohli k vizualizácii dynamiky aktínového cytoskeletu v živých rastlinných bunkách (Chalfie *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2008). Prvý skonštruovaný fúzny proteín bola fúzia GFP s C-terminálnym koncom aktín-viažucej domény (ABD) myšacieho talínu (GFP-mTalin; Kost *et al.*, 1998), ktorý je široko

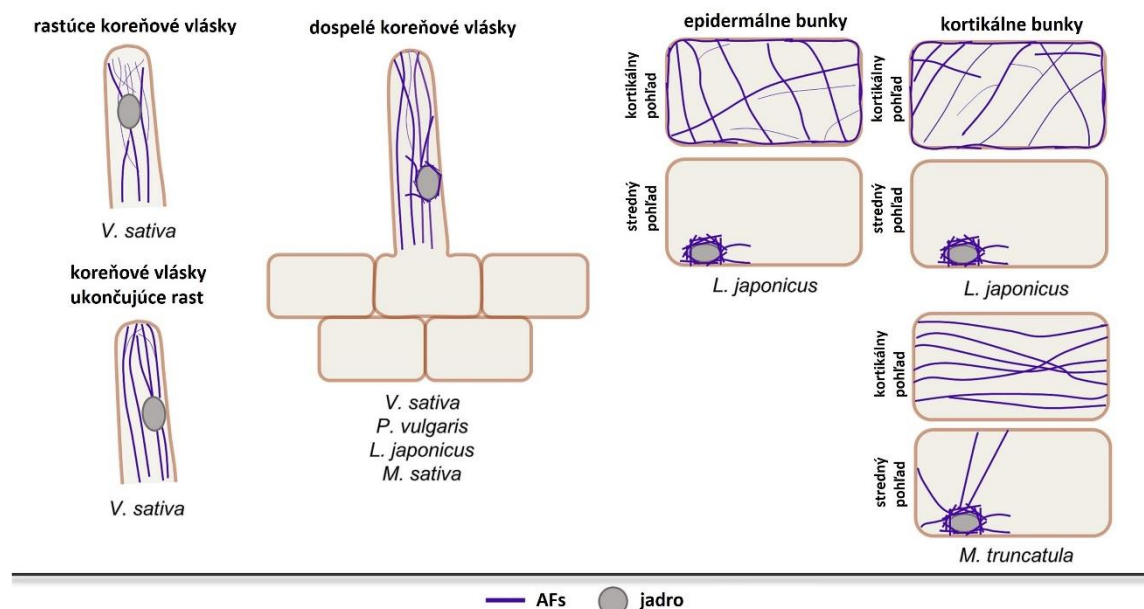
používaný na zobrazovanie organizácie F-aktínu v rôznych rastlinných pletivách. Avšak GFP-mTalin nemusí presne vizualizovať organizáciu aktínu a môže ovplyvniť morfológiu a rast rastlín a interakcie ABPs s aktínom (Ketelaar *et al.*, 2004; Sheahan *et al.*, 2004). Medzi ďalšie vyvinuté fúzne proteíny patria translačné fúzie medzi GFP a aktín-viažucimi doménami (ABDs) z aktín-zosieťujúceho proteínu FIMBRIN1 pochádzajúceho z *A. thaliana*. Ako najlepšie sa preukázal fúzny konštrukt GFP s aktín-viažucou doménou 2 fimbrínu (fABD2). Fúzny proteín GFP-fABD2 umožnil značenie vysoko dynamického aktínového cytoskeletu v rôznych typoch buniek rôznych rastlinných druhov. Jeho expresia neovplyvnila rast rastlín, iba mierne znížila pohyb orgánel v bunkách *A. thaliana*. GFP-fABD2 v súčasnosti poskytuje najlepší dostupný fúzny proteín s GFP na vizualizáciu organizácie a dynamiky aktínových filamentov v rastlinných bunkách (Sheahan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Voigt *et al.*, 2005; Holweg, 2007).

2.3.4 Rola aktínového cytoskeletu v procese rhizobiálnej symbiôzy

2.3.4.1 Organizácia aktínového cytoskeletu v bunkách koreňov strukovín

Aktínové mikrofilamenty vytvárajú rozmanitú vnútrobunkovú architektúru v závislosti od druhu rastlinnej bunky a štádia jej vývoja a diferenciácie. Koreňové vlásky sú prvým typom buniek, ktoré prichádzajú do kontaktu s rhizóbiami a sú nevyhnutné na naviazanie symbiotických interakcií. Aktínový cytoskelet spolu s cytoplazmatickým Ca^{2+} gradientom a vezikulárnym transportom sú kľúčovými zložkami vrcholového rastu koreňových vláskov (Gage, 2004; Šamaj *et al.*, 2004). V rastúcich koreňových vláskoch sa organizácia aktínového cytoskeletu líši v závislosti od vývoja, ako bolo ukázané napríklad u *V. sativa*. Hrubé zväzky aktínových mikrofilamentov s pozdĺžnou orientáciou sú viditeľné v cytoplazmatických vláknach v bazálnych oblastiach aktívne rastúcich koreňových vláskov. V subapikálnej oblasti sa zväzky aktínových vlákien stenčujú do jemných zväzkov alebo sa vyskytujú aj ako jednotlivé vlákna, zatiaľ čo v špičke dlhé aktínové vlákna úplne chýbajú. Takáto konfigurácia aktínových zväzkov sa v subapikálnej oblasti koreňových vláskov označuje ako sieťovo-axiálne jemné zväzky aktínových filamentov (FB-aktín). V koreňových vláskoch ukončujúcich rast sa v subapikálnej oblasti vytvárajú cytoplazmatické vlákna vyplnené aktínovými zväzkami,

ktoré sa dostávajú až ku špičke koreňového vlásku. V dospelých nerastúcich koreňových vláskoch sa hrubé zväzky aktínových vlákien nachádzajú v cytoplazme na periférii a prechádzajú celou špičkou koreňového vlásku (Miller *et al.*, 1999). Ako bolo pozorované v koreňových vláskoch u *P. vulgaris* a *M. sativa*, tenké a dobre definované aktínové mikrofilamenty obklopujú oblasť jadier (Allen a Bennett, 1996; Cárdenas *et al.*, 1998). V epidermálnych bunkách koreňa *L. japonicus* aktínové mikrofilamenty obklopujú jadro a tenké aktínové vlákna vytvárajú sieť s hrubšími zväzkami, ktoré lemujú plazmatickú membránu. V bunkách koreňovej kôry sa nachádza sieť jemných aktínových vlákien prepojených s hrubšími aktínovými zväzkami (Genre a Bonfante, 2002).



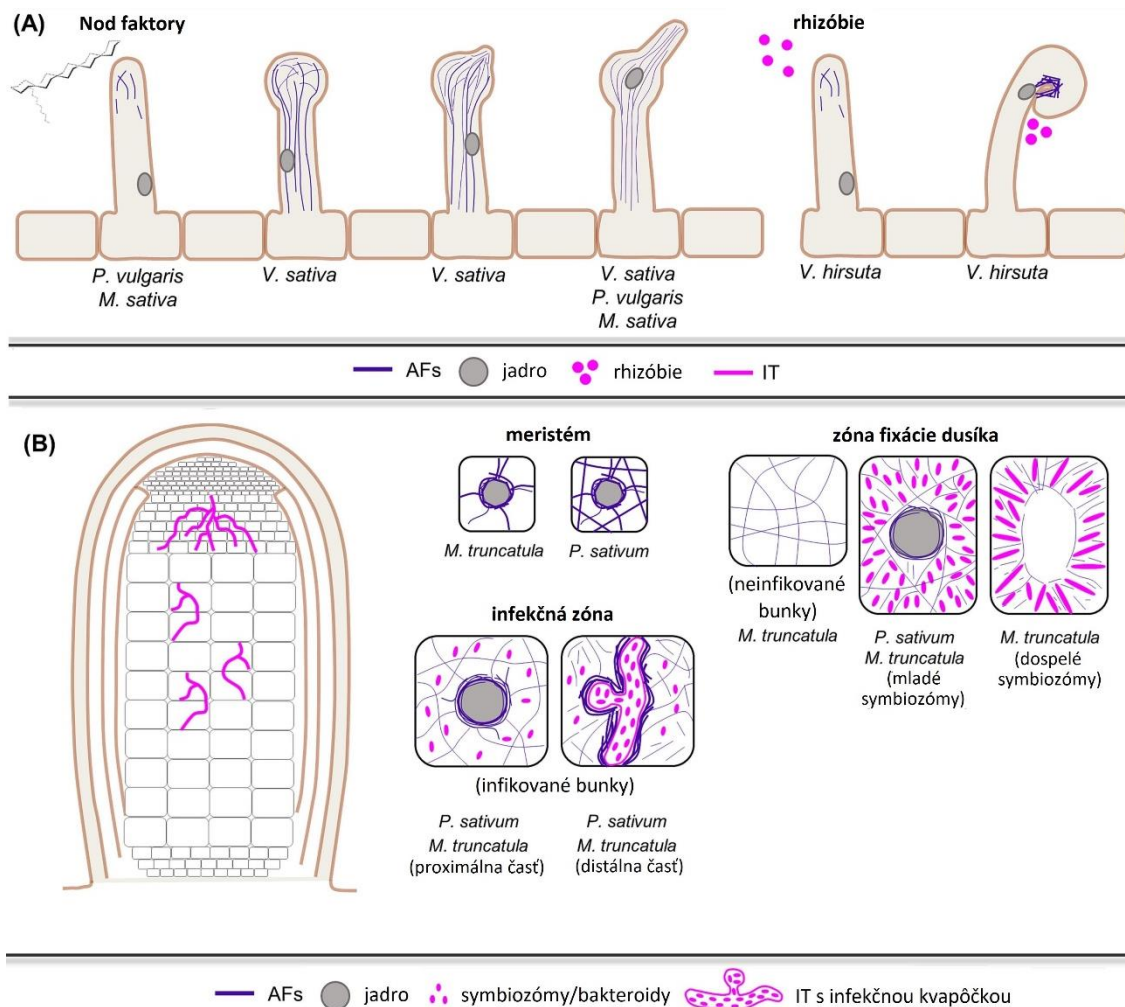
Obrázok 2. Schematické znázornenie organizácie aktínového cytoskeletu v koreňových bunkách strukovín. Usporiadanie aktínových filamentov (AFs, fialová farba) v rastúcich koreňových vláskoch, v koreňových vláskoch, ktoré ukončujú rast špičky, a v dospelých koreňových vláskoch spolu s organizáciou AF v koreňových epidermálnych a kortikálnych bunkách. Upravené podľa Hlaváčková *et al.* (2023a).

2.3.4.2 Organizácia aktínového cytoskeletu v koreňových bunkách strukovín počas symbiotických interakcií

Po rozpoznaní Nod faktorov produkovaných rhizóbiami dochádza v koreňových vláskoch k zmenám a reorganizácii aktínového cytoskeletu. Množstvo štúdií využívalo buď čisté Nod faktory alebo rhizóbiá ako induktory na pozorovanie tejto organizácie a reakcií aktínového cytoskeletu počas rhizobiálnej infekcie (Hlaváčková *et al.*, 2023a). Po aplikácii rhizóbií na koreňové vlásky u *Vicia hirsula* bola pozorovaná fragmentácia aktínových mikrofilamentov a akumulácia vezikúl v mieste stočeného koreňového vlásku (Ridge, 1992). Aplikáciou Nod faktorov z *Rhizobium meliloti* alebo *Rhizobium etli* na koreňové vlásky *M. sativa* a *P. vulgaris* sa počas 15 min zaznamenal rýchly rozpad pozdĺžnych aktínových mikrofilamentov. Táto fragmentácia bola sprevádzaná znížením množstva a dĺžky aktínových zväzkov, akumuláciou difúzneho signálu v odlišných oblastiach špičky koreňového vlásku, a deformáciami koreňového vlasu. Asi hodinu po aplikovaní Nod faktorov sa aktínový cytoskelet čiastočne obnovil a nadobudol organizáciu charakteristickú pre správne sa vyvíjajúce koreňové vlásky (Allen *et al.*, 1994; Allen a Bennett, 1996; Cárdenas *et al.*, 1998). Oproti tomu boli u *V. sativa* po aplikácii NFs pozorované väčšie počty aktínových zväzkov a FB-aktínu v subapikálnej oblasti koreňových vláskov. U koreňových vláskov ukončujúcich rast sa oproti kontrole zdvojnásobil počet zväzkov aktínových vlákien a došlo opätovnému zahájeniu rastu koreňovej špičky. Predpokladá sa, že toto zvýšenie aktínových zväzkov je dôležité na dopravu nových Golgiho vezikúl, čo vedie k deformácii koreňového vlásku (De Ruijter *et al.*, 1999). Deformácia koreňových vláskov je najprv sprevádzaná rozšírením špičky koreňového vlásku, v ktorej dochádza k zmenám orientácie aktínových vlákien a k strate polárneho rastu. Po určitej dobe sa vo výrastkoch z rozšírenej špičky obnoví polárny rast a orientácia aktínového cytoskeletu začne pripomínať tú v rastúcich koreňových vláskoch (Miller *et al.*, 1999). Aktínový cytoskelet je pravdepodobne ďalej potrebný na príjem rhizóbií do koreňových vláskov, pri pohybe jadra počas vývoja IT, pri tvorbe predinfekčných vlákien, a na indukciu bunkového delenia v bunkách koreňovej kôry (Oldroyd *et al.*, 2011). Keď sa Nod faktory z *R. etli* aplikovali na živé koreňové vlásky *P. vulgaris*, počet plus koncov F-aktínu sa zvýšil v blízkosti špičky koreňového vlásku, čo podporuje aktínovú polymerizáciu. V tomto mieste sa rhizóbiá prichytávajú a spôsobujú invagináciu bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány, aby sa začala ich

internalizácia a tvorba IT. Plus konce F-aktínu boli lokalizované taktiež v mieste skorej iniciácie IT (Zepeda *et al.*, 2014).

Štúdie na nedeterminovaných koreňových hľúzkach u *P. sativum* a *M. truncatula* naznačujú, že aktínový cytoskelet hrá rozhodujúcu úlohu pri vývoji koreňových hľúziek, ako je usmerňovanie rastu IT, uvoľňovanie infekčných kvapôčok s rhizóbiami do cytoplazmy hostiteľských buniek, a pri vývoji a dozrievaní symbiozómov v bunkách koreňových hľúziek (Davidson a Newcomb, 2001; Zhang *et al.*, 2019; Hlaváčková *et al.*, 2023a). V neinfikovaných bunkách apikálneho meristému koreňových hľúziek *P. sativum* sú náhodne usporiadané dlhé zväzky aktínových mikrofilamentov, ktoré obopínajú jadro a rozprestierajú sa pozdĺž cytoplazmatických vlákien a plazmatickej membrány. V infikovaných bunkách v skorých fázach majú aktínové zväzky podobnú organizáciu ako v neinfikovaných bunkách, avšak v mieste prieniku IT do bunky a v okolí miesta symbiozómov sa nachádzala difúzna akumulácia aktínu. V starších infikovaných bunkách prevláda v cytosole sieť tenkých zvlnených aktínových zväzkov, ktoré prebiehajú mnohými smermi a môžu určovať rozmiestnenie symbiozómov (Davidson a Newcomb, 2001). U koreňových hľúzok *M. truncatula* bolo identifikovaných päť po sebe nasledujúcich štádií vývoja, ktoré sa vyznačujú jedinečnou štruktúrou aktínového cytoskeletu. Meristematické bunky vykazovali typickú meristematickú organizáciu aktínového cytoskeletu ako je perinukleárna sieť aktínových vlákien spojená s cytoplazmatickými vláknami a kortikálnou časťou buniek. Na periférii infikovaných buniek sa F-aktín fragmentoval na kratšie aktínové vlákna. S vývojom infikovaných buniek sa v zóne fixácie dusíka zvýšila hustota fragmentov F-aktínu a aktínových bodiek. Prítomnosť týchto krátkych fragmentov F-aktínu a aktínových bodiek v okolí symbiozómov je výlučne spozorovaná v infikovaných bunkách. Neinfikované bunky susediace s infikovanými bunkami vykazovali intaktnú sieť aktínového cytoskeletu. Oblasť predlžujúcich sa infekčných vlákien bola obklopená hustou sieťou aktínových vlákien, ktorá usmerňovala ich rast a následné uvoľňovanie rhizóbií vo forme infekčných kvapôčok (Zhang *et al.* 2019).



Obrázok 3. Schematické znázornenie organizácie aktínového cytoskeletu v koreňových bunkách počas rôznych štádií symbiotických interakcií. (A) Organizácia aktínových filamntov (AF; fialová) v reakcii na Nod faktory v koreňových vláskoch bez viditeľných deformácií, v rozšírených koreňových vláskoch, počas tvorby nových výrastkov, v koreňových vláskoch s novovytvoreným výrastkom a počas interakcie s prospešnými rhizóbiemi (ružová). (B) Organizácia aktínových vlákien v infikovaných a neinfikovaných bunkách nedeterminovanej koreňovej hlúzky meristematickej zóny, infekčnej zóny a zóny fixujúcej dusík. Upravené podľa Hlaváčková *et al.* (2023a).

2.4 Moderné neinvazívne techniky mikroskopovania

Na pochopenie molekulárnej a štruktúrnej organizácie rastlinných pletív, orgánov alebo celej rastliny, a dynamického procesu vývoja rastlín, nie sú biochemické a genetické analýzy dostatočné. Je taktiež nutné presne určiť miesto a čas týchto špecifických procesov s primeraným časovým a priestorovým rozlíšením. Po vývoji mnohých fluorescenčných proteínov a pokročilých techník fluorescenčnej mikroskopie je teraz možné monitorovať štruktúru a aktivitu väčšiny organel a subcelulárnych

kompartimentov v živých rastlinných bunkách. Hlavným cieľom zobrazovania živých buniek je nájsť najmenej invazívnu mikroskopickú techniku, ktorá môže dosiahnuť potrebnú citlivosť na získanie dostatočného priestorového a časového rozlíšenia biologických procesov. Pre zobrazovanie fixovaných alebo živých rastlinných buniek po dlhú dobu poskytla najlepšiu možnosť všeobecne zaužívaná konfokálna laserová skenovacia mikroskopia (CLSM) a jej modifikácie, vrátane mikroskopov s rotujúcim diskom a dvoj- a viacfotónových systémov (Reddy *et al.*, 2007; Sappl a Heisler, 2013; Ovečka *et al.*, 2018).

Konfokálne systémy sú na založené skenovaní vzorky laserovým zobrazovacím lúčom a clony („pinhole“), ktorá zabraňuje prechádzaniu fluorescencie z nezaostrených rovín, čo obmedzuje rýchlosť snímania na niekoľko desiatok optických rezov za sekundu. V dôsledku toho je snímanie optických rezov na získanie trojrozmerného obrazu nutné zopakovať v rôznych hĺbkach vzorky. Tento proces je zdĺhavý, čím je trojrozmerné zobrazovanie dynamických procesov často nemožné. Pri dlhodobom zobrazovaní vzorky dochádza k vypaľovaniu fluoroforu a ku fototoxickým procesom v dôsledku excitačného svetla osvetľujúceho veľkú časť vzorky. Konfokálna mikroskopia s rotujúcim diskom využíva sériu dierok na disku, ktorý rotuje vysokou rýchlosťou. Oproti CLSM výrazne zvyšuje rýchlosť snímania vzorky a vďaka zníženej hodnote excitačnej energie redukuje fototoxicitu na vzorke a vypaľovanie fluoroforu. Ďalšími nevýhodami CLSM je horšie snímanie veľkostne objemných rastlinných orgánov kvôli obmedzenej hĺbke zobrazenia a rozlíšenia v Z-rovine. Pre rastúce rastliny je úzky priestor medzi podložným a krycím sklom a snímanie v horizontálnej polohe vážnym obmedzením prirodzených podmienok počas snímania. Pokrok v metódach „light-sheet“ fluorescenčnej mikroskopie a superrozlišovacej mikroskopie spôsobil zásadný prevrat v subcelulárnom a vývojovom zobrazovaní mnohobunkových živých organizmov (Stehbens *et al.*, 2012; Girkin a Carvalho, 2018; Tichá *et al.*, 2020).

2.4.1 „Light-sheet“ fluorescenčná mikroskopia

V súčasnosti sú pokročilé mikroskopické metódy potrebné na neinvazívne štúdium rastlinných buniek, pletív, orgánov a celých rastlín s cieľom zdokumentovať ich rast a vývoj. Metódy „light-sheet“ fluorescenčnej mikroskopie (LSFM) sú novým a inovatívnym nástrojom na dokumentáciu vývojových a bunkových procesov. Princípom LSFM je postupné osvetlenie vzorky tenkou vrstvou svetla pomocou lasera

s nízkym výkonom, čím je osvetlená iba jedna optická rovina preparátu v danom čase. Vyžiarená fluorescenčná emisia z osvetlenej optickej roviny je detekovaná objektívom orientovaným kolmo na rovinu osi osvetlenia. Excitované sú iba molekuly v rámci zobrazovacej roviny, čím sa minimalizuje vypaľovanie fluoroformov a zmierni sa fototoxicita. Rýchlosť a citlivosť snímania optických rezov bola značne zlepšená pomocou kamier s EMCCD senzormi (z angl. „electron-multiplying charge-coupled device“) alebo s sCMOS senzormi (z angl. „scientific Complementary Metal Oxide Semiconductors“), čo umožnilo zobrazovanie rýchlych dynamických biologických procesov v živých bunkách (Girkin a Carvalho, 2018; Ovečka *et al.*, 2018; Ovečka *et al.*, 2022).

LSFM sa stala populárnou neinvazívnou mikroskopickou technikou vďaka rýchlej viacrozmernej vizualizácii a možnosti takmer fyziologického dlhodobého zobrazovania robustných biologických vzoriek. Osvetľovacie a detekčné objektívy sú vo väčšine LSFM systémov umiestnené horizontálne, čím je možné zavedenie rastlinných vzoriek do mikroskopu vo vertikálnej polohe. V tomto prípade sa intaktné rastliny môžu snímať v prirodzenej orientácii v smere rastu, čo je veľkou výhodou oproti CLSM metódam. Nastavenie LSFM môže byť upravené na dlhodobé živé a vývojové zobrazovanie rastlín v takmer prirodzených podmienkach. Na udržanie fyziologických podmienok môžu byť zelené časti rastlín osvetlené pomocou svetelných zdrojov, ktoré kontrolovane simulujú striedanie dňa a noci. Aby sa zaručil prísun živín pre pozorovanú rastlinu, pomocou perfúzneho systému je možná kontinuálna výmena čerstvého tekutého média a odstránenie využitého a odpadového média (Maizel *et al.*, 2011; Ovečka *et al.*, 2015; Ovečka *et al.*, 2018). V rastlinnej biológii bola pre väčšinu aplikácií LSFM použitá modelová rastlina *A. thaliana*. Vďaka jej malému vzrastu a tenkým, takmer priehľadným koreňom je vhodnou rastlinou na štúdium rastu a vývojových procesov, predovšetkým v koreni. Narastá však potreba porozumieť aj vývoju iných rastlín na biotechnologické možnosti zlepšenia ich vlastností. Nedávny pokrok v LSMS technikách a pri príprave vzoriek umožnil zobrazovanie objemnejších plodín ako je *M. sativa*, *Hordeum vulgare* a *Oryza sativa*. Systémy LSFM ponúkajú všestrannosť, ktoré umožňujú prispôsobenie na rôzne experimentálne konfigurácie. To umožňuje skúmať vplyvy určitých chemických zlúčenín, simulované stresové podmienky a interakcie medzi mikroorganizmami a rastlinami ako sú symbiotické interakcie medzi strukovinami a rhizóbiami (Ovečka *et al.*, 2018; Tichá *et al.*, 2020; Ovečka *et al.*, 2022).

2.4.2 Super-rozlišovacia mikroskopia

Super-rozlišovacia mikroskopia (SRM) označuje skupinu mikroskopických techník prekonávajúcich difrakčné obmedzenia a prekračujúcich limity rozlíšenia konvenčných mikroskopických metód. Medzi SRM techniky, ktoré využívajú osvetlenie vzoriek pomocou štruktúrovaného svetla, patrí lineárna a nelineárna mikroskopia so štruktúrovaným osvetlením (SIM) a mikroskopia so stimulovanou redukciou fluorescenčnej stimulovanou emisie (STED) (Komis *et al.*, 2018a). Princípom SIM je využitie štruktúrovaného svetla na osvetlenie vzorky, ktoré vzniká kontrolovateľnými rotáciami a fázovými posunmi mriežky. Počítačovým spracovaním sa jednotlivé obrazy skombinujú a dekonvulujú za účelom rekonštrukcie obrazu s laterálnym rozlíšením okolo 100 nm. SIM je aplikovateľná ako na 2D štruktúry, tak aj na 3D štruktúry a je ju možno použiť na snímanie živých buniek (Gustafsson, 2000; Komis *et al.*, 2018a). Mikroskopia so stimulovanou redukciou fluorescenčnej emisie (STED) je jednoduchá metóda využívajúca dva laserové lúče na osvetlenie vzorky. Jeden z lúčov sa používa na excitáciu vzorky a ďalší lúč s vyššou vlnovou dĺžkou sa využíva na vrátenie excitovaných fluoroforov do základného stavu okrem tých, ktoré sú v strede excitačného ohniska. Oproti SIM má STED mikroskopia lepšie rozlíšenie a taktiež je použiteľná na zobrazovanie živých buniek. Avšak kvôli vysokej fototoxicite nie je vhodná na dlhodobé pozorovania živých rastlinných vzoriek, čím si táto metóda nenašla široké uplatnenie v zobrazovaní rastlín (Dyba a Hell, 2003; Komis *et al.*, 2018a). K ďalším SRM metódam založených na lokalizácii jednotlivých molekúl, ktoré umožňujú skúmať polohu jednotlivých fluoroforov s vysokou presnosťou, patrí fotoaktivačná lokalizačná mikroskopia (PALM) a stochastická optická rekonštrukčná mikroskopia (STORM). PALM je založená na použití fotoaktivovateľných fluorescenčných proteínov, zatiaľ čo STORM využíva organické farbivá s foto-prepínateľnou fluorescenciou. Tieto metódy sú schopné dosiahnuť rozlíšenie niekoľko desiat nanometrov, ale na dosiahnutie dobrej kvality obrazu však musia byť vzorky pevne imobilizované, čo ich robí málo vhodné na dlhodobé zobrazovanie živých rastlinných buniek (Betzig *et al.*, 2006; Rust *et al.*, 2006; Komis *et al.*, 2018a; Ovečka *et al.*, 2022).

Pre budúci výskum vývojových procesov rastlín má veľké opodstatnenie komercializácia hybridných systémov. K takýmto systémom patrí CLSM s použitím Airyscan modulu (ACLSM), ktorý umožňuje zlepšené rozlíšenie až do 120 nm a rýchle zobrazovanie. Deterktor Airyscan je zložený z 32 šesťuholníkových podjednotiek na báze

fosfidovej zliatiny arzenidu gália usporiadaných do kruhu. Každá jednotka má apertúru pinhole o veľkosti 0,25 AU, pričom sa očakáva že celková citlivosť systému sa bude rovnať konfokálnemu nastaveniu pri 1,25 AU. Použitím dekonvolúcie pri rekonštrukcii obrazu je možné získať vyššie rozlíšenie. S kompromisom v rozlíšení, Airyscan systém je schopný v rýchlom zobrazovacom režime zachytiť až 27 snímok za sekundu. Aplikácia ACLSM je možná ako na fixované bunky, tak aj na zobrazovanie živých buniek. ACLSM je vhodná na snímanie imunofluorescenčne značeného cytoskeletu v koreňových epidermálnych bunkách lucerny na úrovni super-rozlíšenia. Nedávno bola táto technika použitá pri štúdiu symbiotických interakcií medzi *M. truncatula* a rhizobiálnym druhom *S. meliloti*. Optimalizovaním prípravy vzorky a namontovaním ACLSM systému do vertikálnej polohy je možné dynamické intaktných rastlín vo fyziologických podmienkach (Korobchevskaya *et al.*, 2017; Komis *et al.*, 2018a; Liang *et al.*, 2018; Tichá *et al.*, 2020; Ovečka *et al.*, 2022).

2.5 Transformácia rastlín *M. sativa*

Kľúčovou stratégiou na zvýšenie kvality rastlín, výnosov plodín a tolerancie k biotickým a abiotickým stresovým faktorom je genetická transformácia rastlín. Genetická transformácia je riadená modifikácia organizmu, ktorej výsledkom je vloženie a následná integrácia zavedenej DNA do hostiteľského genómu, čím sa transgén stáva trvalou súčasťou genómu nového transgénneho organizmu. Početné fyzikálne (priame) alebo biologické (nepriame) techniky transformácie rastlín, väčšinou zahŕňajúce transport exogénnych génov a regeneráciu transformovaných rastlín, boli neustále zdokonaľované pre vysokú účinnosť, aplikáciu a pohodlnú manipuláciu. Aj napriek viac ako 30 rokom technologického pokroku v tejto oblasti je efektívna transformácia a regenerácia pre mnohé plodiny stále výzvou (Keshavareddy *et al.*, 2018; Ramkumar *et al.*, 2020; Steinwand a Ronald, 2020).

K priamym metódam genetickej transformácie, ktoré využívajú chemické alebo fyzikálne sily na prenos cieľových génov do rastlinných buniek, patrí bombardovanie časticami („gene-gun“), elektroporácia, mikroinjekcia, transformácia sprostredkovaná polyetylénglykolom (PEP), karbidom kremíka, či lipozómy. Na rozdiel od toho, nepriama genetická transformácia využíva organizmy ako vektor, ako je prenos génov sprostredkovaný pomocou baktérií *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*. Transformácia prostredníctvom *Agrobacterium* je najúčinnnejšia a najbežnejšia metóda pre získanie stabilných transgénnych rastlín *M. sativa*, avšak je

možné v určitých prípadoch využiť aj transformáciu metódou elektroporácie alebo „gene-gun“ (Keshavareddy *et al.*, 2018; Tichá *et al.*, 2020).

2.5.1 Transformácia prostredníctvom baktérií *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je fytopatogénna gramnegatívna baktéria obsahujúca tumor indukujúci (Ti) plazmid, ktorá spôsobuje u rastlín vznik nádorov. Súčasťou Ti plazmidu je virulentná DNA molekula (T-DNA), ktorá sa prirodzene prenáša do rastlinných buniek, kde sa stabilne integruje do rastlinného genómu. T-DNA obsahuje gény pre syntézu opínov, ktoré slúžia ako zdroj energie a dusíka, a gény podieľajúce sa na syntéze rastlinných hormónov spôsobujúce tvorbu nádorov. Na transport a integráciu T-DNA sú potrebné virulentné proteíny (Vir proteíny), ktoré sú kódované siedmimi lokusmi (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* a *virG*) nachádzajúcimi sa na *vir* regióne Ti plazmidu. Cieľový gén môže byť umiestnený medzi hranice T-DNA a integrovaný do rastlinného genómu. Vývoj súčasného binárneho vektorového systému, ktorého princípom je rozdelenie T-DNA a *vir* regiónov z Ti plazmidu do dvoch menších plazmidov, zlepšila transformačný mechanizmus sprostredkovaný baktériami *Agrobacterium*. Región T-DNA s multiklonovacím miestom, do ktorého sa môžu vložiť požadované gény, je súčasťou ľahko manipulovateľného binárneho vektoru. Pomocný *vir* plazmid obsahujúci *vir* gény pozostáva z odzbrojeného Ti plazmidu, z ktorého bola odstránená oblasť T-DNA (Chilton *et al.*, 1977; Zupan a Zambryski, 1995; Gelvin, 2003; Yildiz *et al.*, 2016).

Genetická transformácia rastlín sprostredkovaná *Agrobacterium* sa môže použiť na genetickú modifikáciu zmenu väčšiny dvojkľúčolistových rastlín a malého počtu jednokľúčolistových rastlín. Medzi jej výhody patrí vysoká účinnosť, nízke náklady, jednoduchá aplikácia a genetická stabilita. Na produkciu stabilných transgénnych rastlín *M. sativa* prostredníctvom baktérií *Agrobacterium* sa najčastejšie používajú listové explantáty, ktoré sú následne po infekcii stimulované k regenerácii transgénnych rastlín pomocou somatickej embryogenézy. Protokol podľa Samac a Austin-Phillips popisuje túto vysoko účinnú transformáciu *M. sativa*, kde typicky 80–100 % transformovaných rastlín po úspešnej regenerácii obsahovalo inkorporovanú T-DNA (Samac a Austin-Phillips, 2006; Yan *et al.*, 2022).

2.5.2 Transformácia metódou „gene-gun“

Transformácia metódou „gene-gun“, taktiež známa ako metóda bombardovania časticami alebo biolistická metóda, je fyzikálna transformačná metóda zavádzania cieľovej DNA priamo do rastlinných buniek. Metóda závisí od nastrelenia častíc s povlakom DNA do cieľových rastlinných buniek. Mikroprojektily sú často tvorené inertným kovovým materiálom, ako je zlato alebo volfrám, s priemerom od 0,2 do 4,0 μm . Na zrýchlenie častíc potiahnutých s DNA sa používajú vysokotlakové impulzy hélia. Mikroprojektily potiahnuté DNA sa naložia na makronosič, z ktorého sú vystrelené v smere k perforovanému zastavovaciemu situ. Zastavovacie sito zachytáva makronosič, čo umožňuje mikroprojektilom postupovať do cieľového tkaniva vysokou rýchlosťou. DNA sa po uvoľnení z mikroprojektilov vo vnútri cieľových buniek začlení do genómovej DNA rastlín. Táto metóda je použiteľná pre širokú škálu rastlinných druhov a väčšinu typov pletív. Transformovanie *M. sativa* metódou bombardovania časticami má oproti transformácii sprostredkovanou *A. tumefaciens* nevýhody ako je menšia účinnosť transformácie a vyššie náklady. Na druhej strane, vloženie DNA priamo do buniek lucerny na produkciu transgénnych rastlín môže ušetriť veľa času a práce (Babaoglu *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2012; Keshavareddy *et al.* 2018; Lacroix *et al.*, 2020; Ramkumar *et al.*, 2020).

2.5.3 Transformácia metódou elektroporácie

Elektroporácia je metóda genetickej transformácie, ktorá využíva krátke elektrické impulzy spôsobujúce zmenu polaritu v plazmatickej membráne cieľových buniek na vytvorenie prechodných pórov, čím sa zvyšuje permeabilita membrány hostiteľskej bunky. Biologické látky ako RNA, DNA, proteíny a lipidy sú často transportované do vnútra buniek protoplastov týmto spôsobom. Transformácia rastlín sprostredkovaná elektroporáciou je v porovnaní s transformáciou sprostredkovanou *Agrobacterium* a biolistickou metódou rýchla, jednoduchá metóda s nízkymi nákladmi a vysokou efektívnosťou. Hlavnou nevýhodou elektroporácie je náročnosť transformácie rastlinných buniek s hrubými bunkovými stenami, a preto je hlavne používaná pre transformáciu protoplastov (Rivera *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

Autoklávová indikátorová páska, bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 μm , čierna plastová fólia, filtračný papier, hliníková fólia, chirurgická páska, kadičky, magnetické miešadlá, mikroskúmavky typu Eppendorf, nožnice, odmerné valce, Pasteurove pipety, Parafilm, pinzety, plastové nádoby, sterilné špáradlá, skúmavky typu Falcon, sterilné špičky, sterilné Petriho misky, sterilné hranaté Petriho misky.

3.1.1 Použité chemikálie

1000X Gamborg's vitamin solution (Duchefa Biochemie)

1000X Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa Biochemie)

Adenín (Sigma-Aldrich)

Dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrogénfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)

Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)

Etanol denaturovaný (96%, Lihovar Kojetín)

Gamborg's B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie)

Gellan gum powder (Alfa Aesar)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

Heptahydrát síranu horečnatého (Sigma-Aldrich)

Heptahydrát síranu železnatého (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)

Chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich)

Chlórnan sodný (Sigma-Aldrich)

Incidur (Ecolab)

Kinetín (Duchefa Biochemie)

Kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) (Duchefa Biochemie)

Kyselina boritá (Duchefa Biochemie)

Kyselina chlorovodíková (37%, Sigma-Aldrich)

LB broth (MO BIO laboratories)
L-glutamín (Duchefa Biochemie)
L-glutati3n (Sigma-Aldrich)
L-prol3n (Sigma-Aldrich)
L-ser3n (Sigma-Aldrich)
MES (Duchefa Biochemie)
Micro agar alebo Phyto agar (Duchefa Biochemie)
Monohydr3t s3ranu mang3nat3ho (Sigma-Aldrich)
Monohydr3t s3ranu zino3nat3ho (Sigma-Aldrich)
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Myoinozitol (Duchefa Biochemie)
Na₂EDTA (Sigma-Aldrich)
Pentahydr3t s3ranu meďnat3ho (Duchefa Biochemie)
Prop3dium jodid (PI, Sigma-Aldrich)
Sachar3za (Sigma-Aldrich)
Steriln3 destilovan3 voda
Streptomyc3n (Duchefa Biochemie)
SYTO 9 (Sigma-Aldrich)
Tetracykl3n (Duchefa Biochemie)
Tikarcil3n (Duchefa Biochemie)
Tris(hydroxymetyl)aminometan (Sigma-Aldrich)
Tween® 20 (Sigma-Aldrich)
Vodovodn3 voda

3.1.1 Použit3 pr3stroje

Analytick3 v3hy (XA 110/2X, RADWAG)
Automatick3 pipety (Eppendorf)
Autokl3v – parn3 steriliz3tor (Stervap, MMM Group)
Box lamin3rny Biohazard (Merci)
Centrif3ga stoln3 chladen3 ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)
Elektromagnetick3 mieš3čka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)
Flourescen3n3 stereomikroskop Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
Hlboko mraziaci box (Panasonic)
Inkubátor s nastaviteľnou teplotou (Mettler)
Konfokálny laserový skenovací mikroskop (CLSM; LSM 710, Axio Imager Z2, Carl Zeiss)
Laboratórna chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)
Laboratórne váhy S1502 (BEL Engineering)
Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)
Laboratórny digestor (M 1200, MERCI)
Mikrocentrifúga s vortexom FVL-2400N (BioSan)
Mikrovlnná rúra MHE21 (HITACHI)
pH meter PC 2700 (Eutech Instruments)
Skener (Image Scanner III)
Spektrofotometer (Smart Spec™ plus, Bio-Rad)
Trepáčka s inkubáciou ES-20 (Biosan)
Vortex Genie - 2 (Scientific Industries)
Výrobník deionizovanej vody Simplicity water purification system (Millipore)

3.1.2 Roztoky a média

Sterilizačný roztok na sterilizáciu listov *M. sativa* (100 ml)

- 1 ml chlórnan sodný
- 50 µl Tween
- Doplňte MilliQ H₂O do 100 ml
- Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórami o veľkosti 0,22 µm

B5H médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 0,5 g·l⁻¹ prolín
- 30 g·l⁻¹ sacharóza
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum
- Doplňte MilliQ H₂O do 1 l

- Upraviť pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizácia autoklávom
- Po sterilizácii autoklávom vychladiť na 55 °C a následne pridať:
 - 30 ml·l⁻¹ zmes aminokyselín
 - 1 ml·l⁻¹ 2,4-D (1 mg·l⁻¹)
 - 1 ml·l⁻¹ kinetínu (0,1 mg·l⁻¹)
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin solution

Zmes aminokyselín

- 6,65 g glutamín
- 0,83 g serín
- 0,004 g adenín
- 0,083 g L-glutatión
- Doplniť MilliQ H₂O do 250 ml
- Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm
- Skladovať pri 4 °C

Zásobný roztok 2,4-D (1,0 mg·ml⁻¹)

- 10 mg 2,4-D rozpustiť v 50 µl Et-OH
- 800 µl MilliQ H₂O
- 150 µl 1M NaOH
- Zmiešať vo vortexe
- Doplniť MilliQ H₂O do 10 ml
- Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm
- Skladovať pri -20 °C

Zásobný roztok kinetínu (0,1 mg·ml⁻¹)

- 1 mg kinetínu rozpustiť v 20 µl 1M NaOH
- Zmiešať vo vortexe
- Doplniť MilliQ H₂O do 10 ml
- Sterilizácia cez bakteriologický filter s pórmí o veľkosti 0,22 µm
- Skladovať pri -20 °C

B50 médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture

- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 0,5 g·l⁻¹ prolín
- 30 g·l⁻¹ sacharóza
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum
- Doplniť MilliQ H₂O do 1 l
- Upraviť pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizácia autoklávom
- Po sterilizácii autoklávom vychladiť na 55 °C a následne pridať:
 - 30 ml·l⁻¹ zmes aminokyselín
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin solution

MMS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 0,1 g·l⁻¹ myoinozitol
- 30 g·l⁻¹ sacharóza
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum
- Doplniť MilliQ H₂O do 1 l
- Upraviť pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizácia autoklávom
- Po sterilizácii autoklávom vychladiť na 55 °C a následne pridať:
 - 1,0 ml·l⁻¹ 1000X Nitsch and Nitsch vitamin solution

MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 30 g·l⁻¹ sacharóza
- 4,5 g·l⁻¹ gellan gum
- Doplniť MilliQ H₂O do 1 l
- Upraviť pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizácia autoklávom

Tekuté LB médium

- 25 g·l⁻¹ LB broth
- Doplniť MilliQ H₂O do 1 l

- Upraviť pH na 7,2 (1M KOH)
- Sterilizácia autoklávom

Tekuté Fahræus médium bez obsahu dusíka

Množstvo použitých zásobných roztokov do média: w/v	zásobných	roztokov:
Makroelementy:		
1 ml·l ⁻¹ MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1232 g·ml ⁻¹	
1 ml·l ⁻¹ KH ₂ PO ₄	0,0953 g·ml ⁻¹	
2 ml·l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,0712 g·ml ⁻¹	
2,5 ml·l ⁻¹ Fe-EDTA		
Mikroelementy:		
100 µl·l ⁻¹ MnSO ₄ · H ₂ O	0,001 g·ml ⁻¹	
100 µl·l ⁻¹ CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0015 g·ml ⁻¹	
100 µl·l ⁻¹ ZnSO ₄ · H ₂ O	0,0017 g·ml ⁻¹	
100 µl·l ⁻¹ H ₃ BO ₃	0,001 g·ml ⁻¹	
100 µl·l ⁻¹ Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0011 g·ml ⁻¹	
<ul style="list-style-type: none"> • Doplniť MilliQ H₂O • Upraviť pH na 6,5 (1M a 0,1M HCl) • Po sterilizácii autoklávom vychladiť na 55 °C a následne pridať: 		
100 µl·l ⁻¹ CaCl ₂	0,11098 g·ml ⁻¹	

Pevné Fahræus médium bez obsahu dusíka

Množstvo zásobných roztokov použitých do média: w/v	zásobných	roztokov:
Makroelementy:		
1 ml·l ⁻¹ MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1232 g·ml ⁻¹	
1 ml·l ⁻¹ KH ₂ PO ₄	0,0953 g·ml ⁻¹	
2 ml·l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,0712 g·ml ⁻¹	
2,5 ml·l ⁻¹ Fe-EDTA		
13 g·l ⁻¹ Microagar		
Mikroelementy:		
100 µl·l ⁻¹ MnSO ₄ · H ₂ O	0,001 g·ml ⁻¹	
100 µl·l ⁻¹ CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0015 g·ml ⁻¹	
100 µl·l ⁻¹ ZnSO ₄ · H ₂ O	0,0017 g·ml ⁻¹	

100 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3BO_3	0,001 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
100 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0011 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<ul style="list-style-type: none"> • Doplniť MilliQ H_2O • Upraviť pH na 6,5 (1M a 0,1M HCl) • Po sterilizácii autoklávom vychladiť na 55 °C a následne pridať: 	
100 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2	0,11098 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Roztok Fe-EDTA (10 ml)

- 0,056 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,074 g Na_2EDTA
- Doplniť MilliQ H_2O do 10 ml
- Rozpustiť pri 50 °C za stáleho miešania

50 mM Tris-HCl pufor, pH 7

- 0,6 g Tris
- 60 ml MilliQ vody
- Upraviť pH na 7 s 1M a 0,1M HCl
- Doplniť MilliQ vodou do 100 ml

Farbiaci roztok SYTO9/PI

- 5 μM SYTO9
- 30 μM PI
- 100 ml 50 mM Tris-HCl pufor, pH 7
- Uschovať do mraziaceho boxu pri - 20 °C

3.1.3 Software na spracovanie výsledkov

Excel 365 (Microsoft Office)

ImageJ (NIH)

PowerPoint 365 (Microsoft Office)

Statistica 13.4.0 (TIBCO Software Inc.)

Zen Black 2.3 PS1 (Carl Zeiss)

Zen Blue 2014 ver. 2.3 (Carl Zeiss)

Zen Lite 3.3 (Carl Zeiss)

3.1.4 Rastlinný materiál

Medicago sativa L. divoký typ, kultivar Regen-SY (RSY)

Medicago sativa L. transgénná línia s vloženým konštruktom *35S::GFP:FABD2* (označované v práci ako GFP-FABD2, Ovečka *et al.*, 2022)

Medicago sativa L. transgénná línia s vloženým konštruktom *SIMKK-RNAi* (Bekešová *et al.*, 2015; Hrbáčková *et al.*, 2021)

Medicago sativa L. transgénná línia GFP-FABD2 s vloženým konštruktom *SIMKK-RNAi* (označované v práci ako *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, Urbiš, 2020)

Pred začiatkom riešenia diplomovej práce boli transgenné línie GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi* vytvorené stabilnou transformáciou listových explantátov prostredníctvom *A. tumefaciens* z rastlín *M. sativa* kontrolnej línie RSY. Dvojité transgénné línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} so zníženou produkciou proteínu SIMK bola pripravená stabilnou transformáciou listových explantátov z donorových rastlín *M. sativa* transgénnéj línie GFP-FABD2 pomocou *A. tumefaciens* (Urbiš, 2020). Ako kontrola pre transgénnu líniu *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} slúžila transgénná línia *SIMKK-RNAi*, so silne down-regulovanými proteínmi SIMKK (stresom indukovaná mitogénom aktivovaná proteínkináza kináza) a SIMK. Spomenuté kontrolné a transgenné rastliny *M. sativa* boli regenerované procesom nepriamej somatickej embryogenézy a kultivované vo fytotrone pri teplote 24 °C, relatívnej vlhkosti 70 %, intenzite svetla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma.

3.1.5 Bakteriálny materiál

Kmeň *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 obsahujúci plazmid pHC60 (tet^R), kódujúci fluorescenčný proteín mRFP (Boivin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2016). Tento kmeň bol dodaný prof. Dr. Karstenom Niehausom, Univerzita Bielefeld, Nemecko.

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava B5H média

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu s Gamborg's B5 basal salt mixture, MgSO₄·7H₂O, KNO₃, sacharózou, prolínom a s gellan gum. Objem

bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené pomocou 1M KOH na 5,7 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 1 l sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí média na približne 55 °C bola v sterilnom prostredí laminárneho boxu pridaná do objemu 500 ml zmes vitamínov (1000X Gamborg's vitamin solution), hormóny (kinetín a 2,4-D), zmes aminokyselín a antibiotikum tikarcilín (TIC) v riedení 1000x (500 µl TIC na 500 ml média). Médium bolo rozliate v laminárnom boxe do 40 sterilných Petriho misiek po 25 ml a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.2 Príprava B50 média

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu s Gamborg's B5 basal salt mixture, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KNO_3 , sacharóza, prolín a s gellan gum. Objem bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené pomocou 1 M KOH na 5,7 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 1 l sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí média na približne na 55 °C bola v sterilnom prostredí laminárneho boxu pridaná do objemu 500 ml zmes vitamínov (1000X Gamborg's vitamin solution), zmes aminokyselín a antibiotikum tikarcilín (TIC) v riedení 1000x (500 µl TIC na 500 ml média). Médium bolo rozliate v laminárnom boxe do 40 sterilných Petriho misiek po 25 ml a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.3 Príprava MMS média

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu s MS basal salt mixture, sacharózou, myoinozitolom, a s gellan gum. Objem bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené pomocou 1 M KOH na 5,7 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 1 l sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí média na približne 55 °C bola v sterilnom prostredí laminárneho boxu pridaná do objemu 500 ml zmes vitamínov (1000X Nitsch and Nitsch vitamin solution) a antibiotikum tikarcilín (TIC) v riedení 1000x (500 µl TIC na 500 ml

média). Médium bolo rozliate v laminárnom boxe do 20 sterilných hranatých Petriho misiek po 50 ml a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.4 Príprava MS média

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu s MS basal salt mixture, sacharózou a s gellan gum. Objem bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené pomocou 1 M KOH na 5,7 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 1 l sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí média na približne 55 °C bolo rozdelené za sterilných podmienok v laminárnom boxe do 20 sterilných hranatých Petriho misiek po 50 ml a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.5 Príprava pevného Fahræus média bez obsahu dusíka

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu s makro- a mikroelementami zo zásobných roztokov a s Mikroagarom (Fahraeus, 1957, upravené). Objem bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené pomocou 1 M HCl na 6,5 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 1 l sklenených fliaš po 500 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí média na približne 55 °C bolo v sterilnom prostredí laminárneho boxu pridané do objemu 500 ml 50 µl CaCl₂. Médium bolo rozliate v laminárnom boxe do 20 sterilných hranatých Petriho misiek po 50 ml a uložené do chladničky na ďalšie použitie.

3.2.6 Príprava tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu s makro- a mikroelementami zo zásobných roztokov (Fahraeus, 1957, upravené). Objem bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 500 ml a pH bolo upravené pomocou 1 M HCl na 6,5 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí média na približne 55 °C bolo v

sterilnom prostredí laminárneho boxu pridané do objemu 250 ml 25 μ l CaCl₂ a uložené do ukladacieho priestoru na ďalšie použitie.

3.2.7 Príprava LB média

Do 1 l kadičky bola pridaná MilliQ voda, ktorá bola zmiešaná spolu so zmesou LB broth. Objem bol pomocou odmerného valca doplnený MilliQ vodou do 1000 ml a pH bolo upravené pomocou 1 M KOH na 7,2 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Médium bolo rozdelené do dvoch 500 ml sklenených fliaš po 250 ml a sterilizované pomocou autoklávu. Po sterilizácii autoklávom a vychladnutí 55 °C bolo uložené do ukladacieho priestoru na ďalšie použitie.

3.2.8 Odobranie a povrchová sterilizácia listov z donorových rastlín

Zdravé, dobre vyvinuté a nepoškodené listy boli odobrané z kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* rastúcich v pôde vo fytotrone do 50 ml skúmavky Falcon s vodovodnou vodou. Sterilizácia listov bola prevedená v sterilnom prostredí laminárneho boxu pomocou 70 % etanolu po dobu 5 až 10 sekúnd. Následne boli listy vložené do sterilizačného roztoku (1 % chlórnan sodný + 0,05 % Tween) vo Falcon skúmavke a pretrepávané po dobu 1,5 minúty. Nakoniec boli listy 3x prepláchnuté sterilnou MilliQ vodou a umiestnené na sterilný filtračný papier na Petriho miske, kde boli pomocou sterilného skalpela priečne prerezané na polovicu a následne takto pripravené listové explantáty boli premiestnené na označené B5H médium s tikarcilínom v guľatých Petriho miskách na indukciu kalogenézy.

3.2.9 Regenerácia rastlín procesom somatickej embryogenézy

Sterilné listové explantáty kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* prenesené na B5H médium s prídavkom tikarcilínu na indukciu kalogenézy boli kultivované vo fytotrone pri teplote 24 °C, relatívnej vlhkosti 70 %, intenzite svetla 60–80 μ E·m⁻²·s⁻¹ a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma po dobu troch týždňov. Následne boli vyvinuté kalusy prenesené na B50 médium s pridaným tikarcilínom na indukciu a vývoj somatických embryí za rovnakých podmienok po dobu troch týždňov. Zrelé somatické embryá boli ďalej prenesené na MMS médium s tikarcilínom a kultivované po dobu jedného až dvoch týždňov za rovnakých podmienok na správny vývin koreňovej časti

a výhonkov. Na dokončenie vývinu celých rastlín a ich udržiavanie boli nakoniec mladé rastliny prenesené na MS médium, kde boli naďalej kultivované v *in vitro* podmienkach. Jednotlivé štádia nepriamej somatickej embryogenézy boli pozorované pri prechádzajúcom svetle a cez fluorescenčný kanál pre GFP signál (excitácia pri 488 nm, emisné spektrum 500-550 nm) priamo na Petriho miskách pomocou fluorescenčného stereomikroskopu Axio Zoom.V16 v rôznych časových intervaloch.

3.2.10 Príprava kultúry *S. meliloti* zo zásobného roztoku

Kultúra baktérií *S. meliloti* Sm2011 produkujúca fluorescenčný proteín mRFP bola pripravená zo zásobného roztoku s glycerolom, ktorý bol uschovaný v mraziacom boxe pri teplote -80 °C. V sterilnom prostredí laminárneho boxu boli do 10 ml LB média v skúmavke Falcon pridané selekčné antibiotiká tetracyklín (20 µl) a streptomycín (4 µl) vo výslednej koncentrácii 20 µg·ml⁻¹ a 500 ul bakteriálnej kultúry zo zásobného roztoku. Bakteriálna kultúra v skúmavke Falcon s LB médiom bola inkubovaná na trepačke v úplnej tme pri teplote 28 °C a pri 200 otáčkach za minútu počas dvoch dní. Pomocou spektrometra bola kontrolovaná optická hustota pri 600 nm (OD₆₀₀), kde LB médium so selekčnými antibiotikami bez bakteriálnej kultúry slúžil ako kontrola (blank). Po dosiahnutí OD₆₀₀ nad 0,5 sa separovali bakteriálne kultúry od LB média pomocou centrifúgy pri 3500 otáčok za minútu (rpm) po dobu 20 minút a pri laboratórnej teplote. Supernatant bol vyliaty do odpadu a pelet s bakteriálnymi bunkami bol resuspendovaný v čistom tekutom Fahræus médiu bez dusíka v takom množstve aby výsledná OD₆₀₀ sa rovnala 0,5. Bakteriálna kultúra v skúmavke Falcon s tekutým Fahræus médiom bez dusíka bola inkubovaná na trepačke počas troch hodín pri teplote 28 °C a pri 200 otáčkach za minútu.

3.2.11 Kokultivácia rastlín *M. sativa* s baktériami *S. meliloti*

Kontrolné a transgénne rastliny *M. sativa* rastúce na MS médiu boli preložené na Petriho misky s pevným Fahræus médiom bez obsahu dusíka. Po 8 dňoch boli na koreňové systémy rastlín aplikované predom pripravené bakteriálne kultúry *S. meliloti* produkujúce mRFP z tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka (2 ml na rastlinu, OD₆₀₀ = 0,5). Rastliny *M. sativa*, na ktoré bolo aplikované čisté tekuté Fahræus médium bez dusíka, slúžili ako „mokrú“ kontrola. Spodná časť Petriho misiek bola zakrytá pomocou čiernych

plastových fólií, aby koreňové systémy rastlín mali podobné svetelné podmienky ako v pôde. Rastliny *M. sativa* spolu so *S. meliloti* produkujúce mRFP boli kultivované vo fytotrone pri teplote 24 °C, relatívnej vlhkosti 70 %, intenzite svetla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma. Počítanie infekčných vlákien prebiehalo v 6. a 11. deň po inokulácii pomocou fluorescenčného stereomikroskopu Axio Zoom.V16 a počítanie koreňových hľúzok prebiehalo v 20. a 25. deň po inokulácii v tom istom mikroskope. Rastliny na Petriho miskách boli skenované pomocou skeneru Image Scanner III a dĺžky koreňových systémov boli merané pomocou programu ImageJ.

3.2.12 Mikroskopická analýza symbiotických interakcií v koreňových bunkách *M. sativa*

Príprava mikroskopických preparátov prebiehala tak, že na okraj podložného sklíčka boli prilepené pásiky obojstrannej lepiacej pásky a do stredu bolo napipetovaných 30 μl tekutého Fahræus média bez obsahu dusíka. Odrezaná časť koreňa z rastlín *M. sativa* kokultivovanými so *S. meliloti* bola prenesená do média na podložnom sklíčku. Preparát bol zakrytý krycím sklíčkom a priestor okolo preparátu vo vytvorenej komôrke bol doplnený s tekutým médiom. Na stabilizáciu preparátu a zabráneniu vyschnutia média bol použitý parafilm. Na mikroskopií boli využité rastliny s najvyššou intenzitou fluorescenčného signálu GFP a tie časti koreňov, ktoré reagovali na prítomnosť *S. meliloti*. Transgénne línie GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} s fluorescenčne značeným aktínovým cytoskeletom boli použité na analýzu zmien štruktúry aktínového cytoskeletu. Ako kontrola reakcie na aplikované baktérie bola použitá RSY línia a transgénna línia *SIMKK-RNAi*. Okrem rastlín *M. sativa* po inokulácii so *S. meliloti* boli použité rastliny z „mokrej“ kontroly na určenie štruktúry, organizácie a dynamiky aktínového cytoskeletu v koreňových vláskoch transgénnych línií GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} v kontrolných podmienkach, teda bez baktérií. Snímky boli vytvorené pomocou konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom Axio Observer.Z1 s objektívom EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27. Preparáty boli snímané pri prechádzajúcom svetle, vo fluorescenčnom kanáli pre GFP signál na dokumentáciu organizácie aktínového cytoskeletu (excitácia pri 488 nm, emisné maximum pri 509 nm) a vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP na dokumentáciu baktérií *S. meliloti* v priebehu symbiotického procesu (excitácia pri 561 nm, emisné maximum pri 612 nm).

Mikroskopické snímky boli ďalej spracované pomocou programov Zen Blue 3.2, Zen Lite 3.3, Microsoft Power Point 365 a ImageJ.

3.2.13 Kvantitatívna analýza distribúcie intenzity fluorescence

Údaje zo snímania symbiotických interakcií z konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom boli kvantitatívne vyhodnotené pomocou meraní priemernej intenzity fluorescence GFP-FABD2 v špecifických oblastiach záujmu v skorých symbiotických štádiách okolo infekčných váčkov a IT (10 – 13 dpi) u kontrolných a transgénnych línií rastlín *M. sativa*. Zmeraná plocha a intenzity špičiek koreňových vláskov rastlín *M. sativa* transgénnych línií GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} v interakcii s rhizóbiami slúžili ako kontrola. Namerané plochy a intenzity v oblastiach infekčných váčkov, IT a špičiek koreňových vláskov boli vybrané a zmerané z konfokálnych rezov jednej roviny manuálne pomocou nástroja na kreslenie softvéru ZEN na základe veľkosti.

3.2.14 Mikroskopická analýza štruktúry aktínového cytoskeletu v koreňových hlúčkach

Na mikroskopickú analýzu boli odobrané funkčné koreňové hlúčky vytvorené 25–27 dní po inokulácii so *S. meliloti* z rastlín *M. sativa* kultivaru RSY, a transgénnych línií GFP-FABD2, *SIMKK-RNAi* a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Funkčné koreňové hlúčky boli selektované podľa ich veľkosti a ružovej farby na rozdiel od nefunkčných (senescentných), ktoré boli menšie a mali hnedú farbu. Na podložné sklíčko bola pridaná MilliQ voda a odrezaná časť koreňa s funkčnou koreňovou hlúčkou. Pomocou žiletky a pinzety boli koreňové hlúčky pozdĺžne narezané na tenké rezy, ktoré sa preniesli na podložné sklíčko s prilepenými pásikmi obojstrannej lepiacej pásky a 30 µl MilliQ vody. Preparát bol zakrytý krycím sklíčkom a priestor vo vytvorenej komôrke bol doplnený MilliQ vodou. Na zabránení vyschnutia bol preparát prelepený parafilmom. Snímky boli vyhotovené pomocou konfokálneho mikroskopu LSM 710, Axio Imager 2 s objektívmi EC Plan Neofluar 10x/0.30 M27 a Plan Aplanachromat 40x/1.4 Oil DIC M27. Snímky preparátov boli zachytené pri prechádzajúcom svetle, vo fluorescenčnom kanáli pre GFP signál na dokumentáciu organizácie aktínového cytoskeletu (excitácia pri 488 nm, emisné spektrum pri 491-551 nm) a vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP na dokumentáciu baktérií *S. meliloti* v infikovaných bunkách koreňovej hlúčky (excitácia pri 561 nm,

emisné spektrum pri 582-677). Mikroskopické snímky boli ďalej spracované pomocou programov Zen Black 2.3, Zen Lite 3.3, Microsoft Power Point 365 a ImageJ.

3.2.15 Histochemické značenie živých a mŕtvych buniek v koreňových hľúzkach

Na histochemické značenie živých a mŕtvych buniek boli použité koreňové hľúzky odobraté 25 dní po inokulácii so *S. meliloti* z rastlín *M. sativa* kultivaru RSY, a transgénnych línií GFP-FABD2, *SIMKK-RNAi* a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Pomocou žiletky a pinzety boli koreňové hľúzky pozdĺžne narezané na tenké rezy a vložené do 20 ml farbiaceho roztoku, ktorý obsahoval zmes SYTO9 a PI. Tenké rezy koreňových hľúzkov boli farbené za tmy po dobu 20 min. Po uplynutí 20 min boli rezy koreňových hľúzkov vložené na podložné sklíčko s 30 μ l MilliQ vody a s prilepenými pásikmi obojstrannej lepiacej pásky. Preparát bol zakrytý krycím sklíčkom, doplnený MilliQ vodou a zalepený parafilmom. Snímky boli vyhotovené pomocou konfokálneho mikroskopu LSM 710, Axio Imager 2 s objektívmi EC Plan Neofluar 10x/0.30 M27 a Plan Aplanachromat 40x/1.4 Oil DIC M27. Preparát bol snímaný pri prechádzajúcom svetle, vo fluorescenčnom kanály pre SYTO9 (excitácia pri 488 nm, emisné maximum pri 504 nm) a vo fluorescenčnom kanály pre PI (excitácia pri 535 nm, emisné maximum pri 617 nm). Mikroskopické snímky boli ďalej spracované pomocou programov Zen Black 2.3, Zen Lite 3.3, Microsoft PowerPoint 365 a ImageJ.

3.2.16 Štatistická analýza

Na štatistické vyhodnotenie nameraných hodnôt bol použitý program Statistica 13.4 a štatistická preukaznosť ($P < 0,05$) bola stanovená jednosmernou ANOVA analýzou a následným post-hoc Tukey HSD testom. Grafy boli pripravené v programe Microsoft Excel 365 a finalizované pomocou programu Microsoft PowerPoint 365. Počet vzoriek (N) a typ štatistického testu sú zahrnuté v legendách obrázkov.

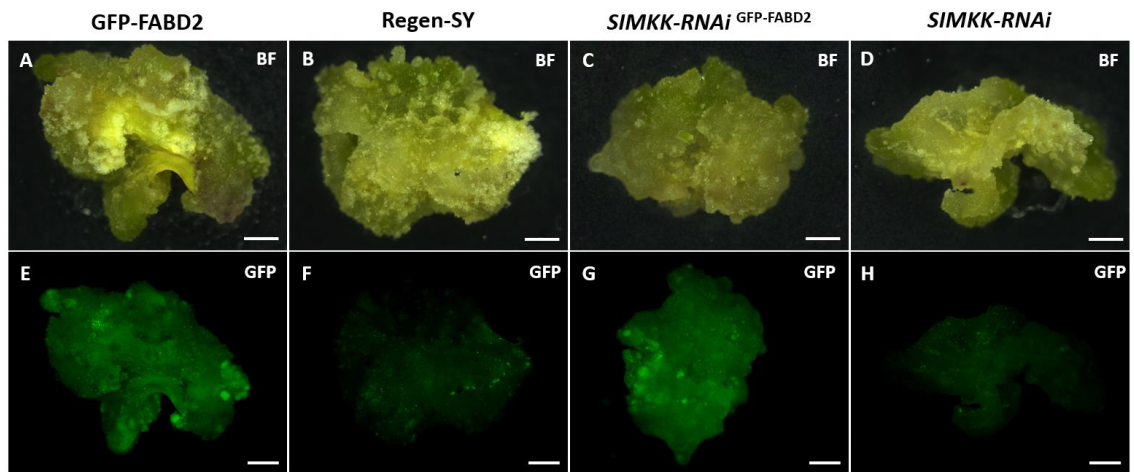
4 VÝSLEDKY

4.1 Regenerácia rastlín *M. sativa* pomocou somatickej embryogenézy

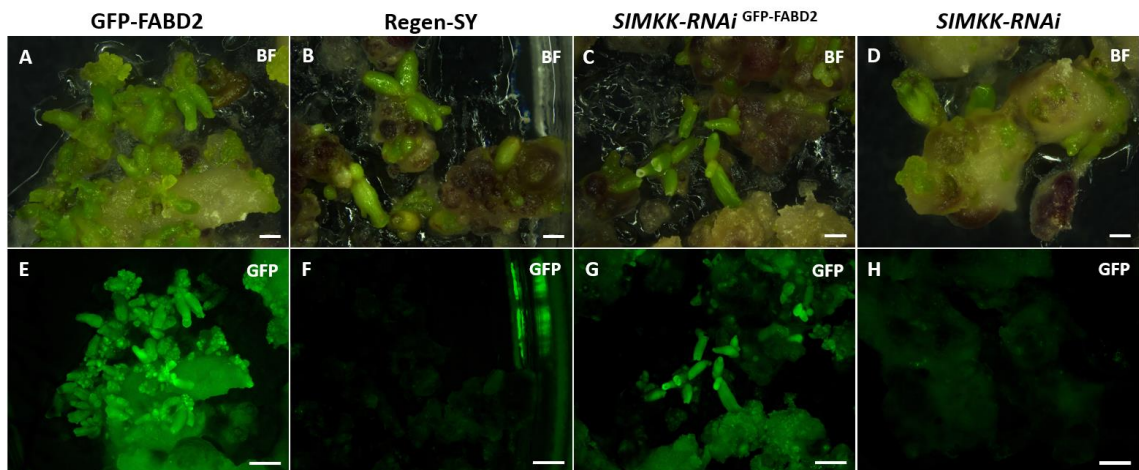
Príprava rastlinného materiálu *M. sativa* u všetkých línií (kultivar Regen-SY, GFP-FABD2, *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, *SIMKK-RNAi*) prebiehala *in vitro* prostredníctvom nepriamej somatickej embryogenézy z listových explantátov. Listové explantáty boli po sterilizácii a prenesení na B5H médium (Obr. 4) s tikarcilínom (+ TIC) a obsahujúce rastlinné hormóny 2,4-D a kinetin, kultivované po dobu troch týždňov, čo viedlo indukcii tvorby kalusu zo somatických buniek (Obr. 5). Po tejto dobe boli jednotlivé kalusy prenesené na B50 médium (+ TIC) bez prídavku hormónov a kultivované po dobu ďalších troch týždňov na tvorbu somatických embryí (Obr. 5A-D a 6A-D). Zrelé somatické embryá torpédovitého tvaru boli prenášané na MMS médium (+ TIC) obohatené o vitamíny. Rastúce somatické embryá s vyvinutým koreňom a kľúčnymi listami (kotyledonmi) sa preniesli na MS médium na dokončenie vývinu rastlín a na ich udržiavanie v *in vitro* podmienkach. Počas jednotlivých štádií regenerácie boli rastliny *M. sativa* kultivované vo fytotrone pri teplote 24 °C, relatívnej vlhkosti 70 %, intenzite svetla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma. U transgénnych línií *M. sativa* GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} produkujúcich fluorescenčný marker aktínového cytoskeletu bol detekovaný fluorescenčný signál GFP, zatiaľ čo kultivar RSY a transgénna línia *SIMKK-RNAi* slúžiace ako kontrola tento špecifický fluorescenčný signál GFP nevykazovali (Obr. 5E-H a 6 E-H). U kontrolných línií bola zaznamenaná len slabá miera autofluorescencie. Regenerované rastliny *M. sativa* boli použité v rámci nasledujúcich experimentov s inokuláciou so *S. meliloti*.



Obrázok 4. Listové explantáty rastlín *M. sativa* transgénnej línie (A) GFP-FABD2, (C) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (D) *SIMKK-RNAi*, a (B) kultivar Regen-SY po 8 dňoch na B5H médiu (+ TIC). Snímky sú zobrazené prechádzajúcom svetle (BF). Mierka = 1 mm.



Obrázok 5. Indukcia kalogenézy listových explantátov rastlín *M. sativa* transgéennej línie (A, E) GFP-FABD2, (C, G) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (D, H) *SIMKK-RNAi* a (B, F) kultivar Regen-SY po 21 dňoch na B5H médiu (+ TIC). (A-D) prechádzajúce svetlo (BF); (E-H) fluorescenčný kanál pre GFP. Mierka = 2 mm.



Obrázok 6. Tvorba somatických embryí z kalusov u transgéennej línie (A,E) GFP-FABD2, (C,G) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (D,H) *SIMKK-RNAi* a (B,F) kultivar Regen-SY po 21 dňoch na B50 médiu (+ TIC). (A-D) prechádzajúce svetlo (BF); (E-H) fluorescenčný kanál pre GFP. Mierka = 1 mm (A-D), 2 mm (E-H).

4.2 Kokultivácia rastlín *M. sativa* s baktériami *S. meliloti*

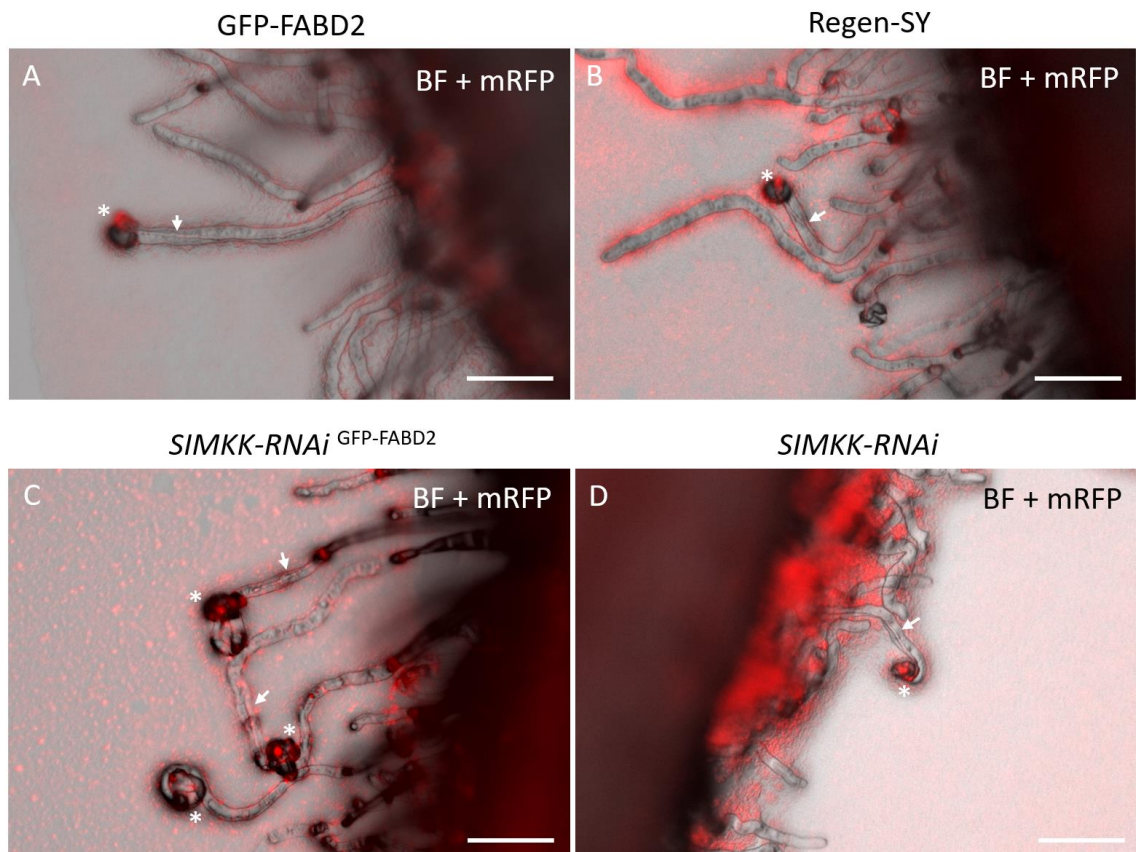
Regenerované kontrolné a transgénne rastliny *M. sativa* prostredníctvom somatickej embryogenézy a kultivované na MS médiu, boli prenesené na Fahræus médium bez obsahu dusíka, ktoré indukovalo podmienky potrebné na spustenie symbiotického procesu. Po 8 dňoch bola na rastliny *M. sativa* aplikovaná predom pripravená bakteriálna kultúra *S. meliloti* produkujúca fluorescenčný proteín mRFP (Obr. 7). Počas celej doby kokultivácie boli rastliny *M. sativa* kultivované vo fytotrone pri teplote 24 °C, relatívnej vlhkosti 70 %, intenzite svetla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma (Obr. 8). Kontrolné aj transgénne rastliny *M. sativa* reagovali na prítomnosť *S. meliloti* deformáciou koreňových vláskov, internalizáciou baktérií, vytváraním infekčných váčkov a tvorbou infekčných vlákien. Tieto skoré štádia symbiotického procesu boli pozorované u kontrolných aj u transgénnych rastlinách *M. sativa* priamo na Petriho miskách pomocou fluorescenčného stereomikroskopu (Obr. 9). Na rastlinách *M. sativa* kokultivovaných so *S. meliloti* sa po čase začali aj vytvárať funkčné, ale aj senescentné koreňové hľúžky, ktoré sú od seba farebne a tvarovo odlišiteľné. Funkčné koreňové hľúžky, v ktorých prebieha asimilácia dusíka, majú ružovú farbu a oválny tvar, zatiaľ čo senescentné neaktívne koreňové hľúžky sú tmavohnedé, guľaté a ďalej nerastú (Obr. 10). V priebehu kokultivácie bola vyhodnotená efektivita tvorby infekčných vlákien a koreňových hľúžok u rastlín *M. sativa* kultivaru RSY, a u transgénnych línií GFP-FABD2, *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a *SIMKK-RNAi* s baktériami *S. meliloti*.



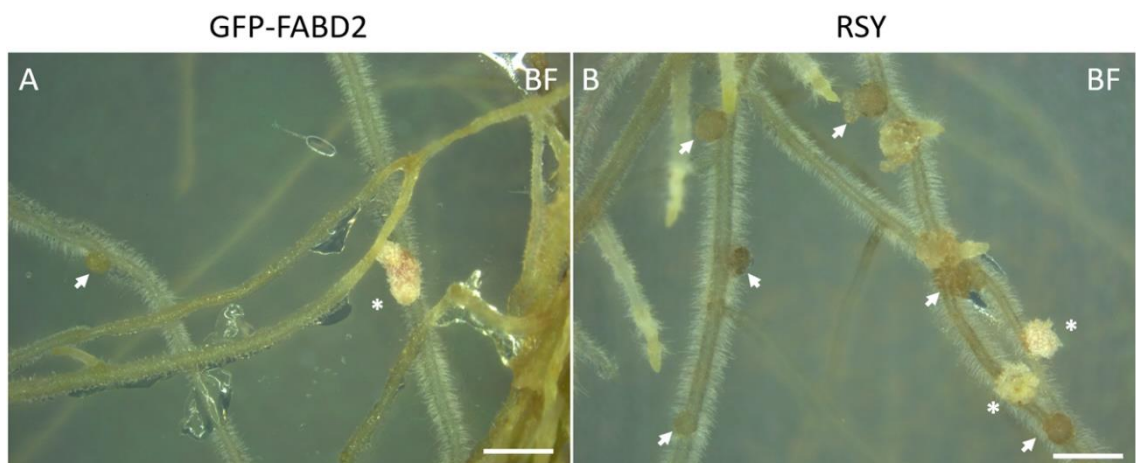
Obrázok 7. Rastliny *M. sativa* (A) GFP-FABD2 línie, (B) RSY línie, (C) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} línie a (D) *SIMKK-RNAi* línie na Fahræus médiu bez dusíka v deň aplikácie *S. meliloti* s produkciou mRFP. Mierka = 1 cm.



Obrázok 8. Rastliny *M. sativa* (A) GFP-FABD2 línie, (B) RSY línie, (C) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} línie a (D) *SIMKK-RNAi* línie kokultivované so *S. meliloti* s produkciou mRFP na Fahræus médiu bez dusíka 25 dní po aplikácii. Mierka = 1 cm.



Obrázok 9. Tvorba infekčných vlákien v koreňových vláskoch u rastlín *M. sativa* (A) GFP-FABD2 línie, (B) RSY línie, (C) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} línie a (D) *SIMKK-RNAi* línie 6 dní po inokulácii so *S. meliloti* na Fahræus médiu bez obsahu dusíka. Snímky sú zobrazené ako prekryv prechádzajúceho svetla (BF) a fluorescenčného kanálu pre mRFP. Šípkami sú označené infekčné vlákna a hviezdičky označujú zakrútené koreňové vlásky s infekčnými váčkami. Mierky = 100 µm.



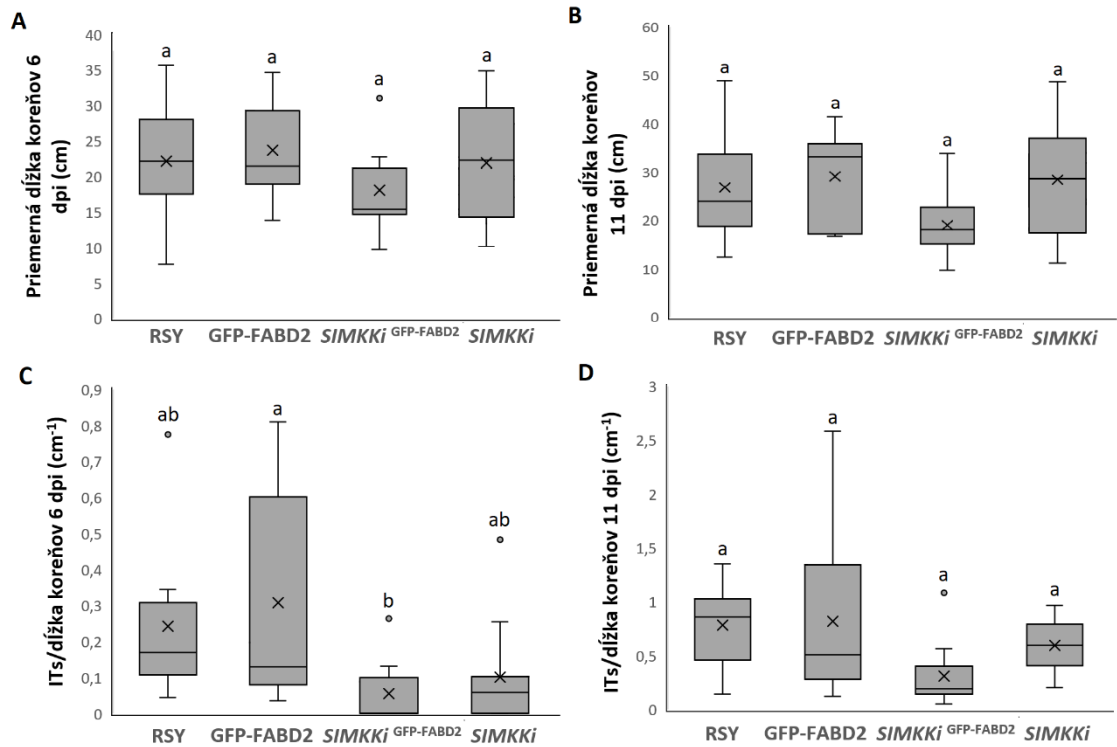
Obrázok 10. Koreňové hľúzky u rastlín *M. sativa* (A) GFP-FABD2 línie a (B) kultivaru RSY 20 dní po inkulácii so *S. meliloti* na Fahræus médiu bez obsahu dusíka. Snímky sú zobrazené v prechádzajúcom svetle. Hviezdičky označujú funkčné koreňové hľúzky a šípkami označujú senescentné koreňové hľúzky. Mierka = 2 cm.

4.3 Kvantitatívne vyhodnotenie efektivity tvorby infekčných vlákien a koreňových hlúčok

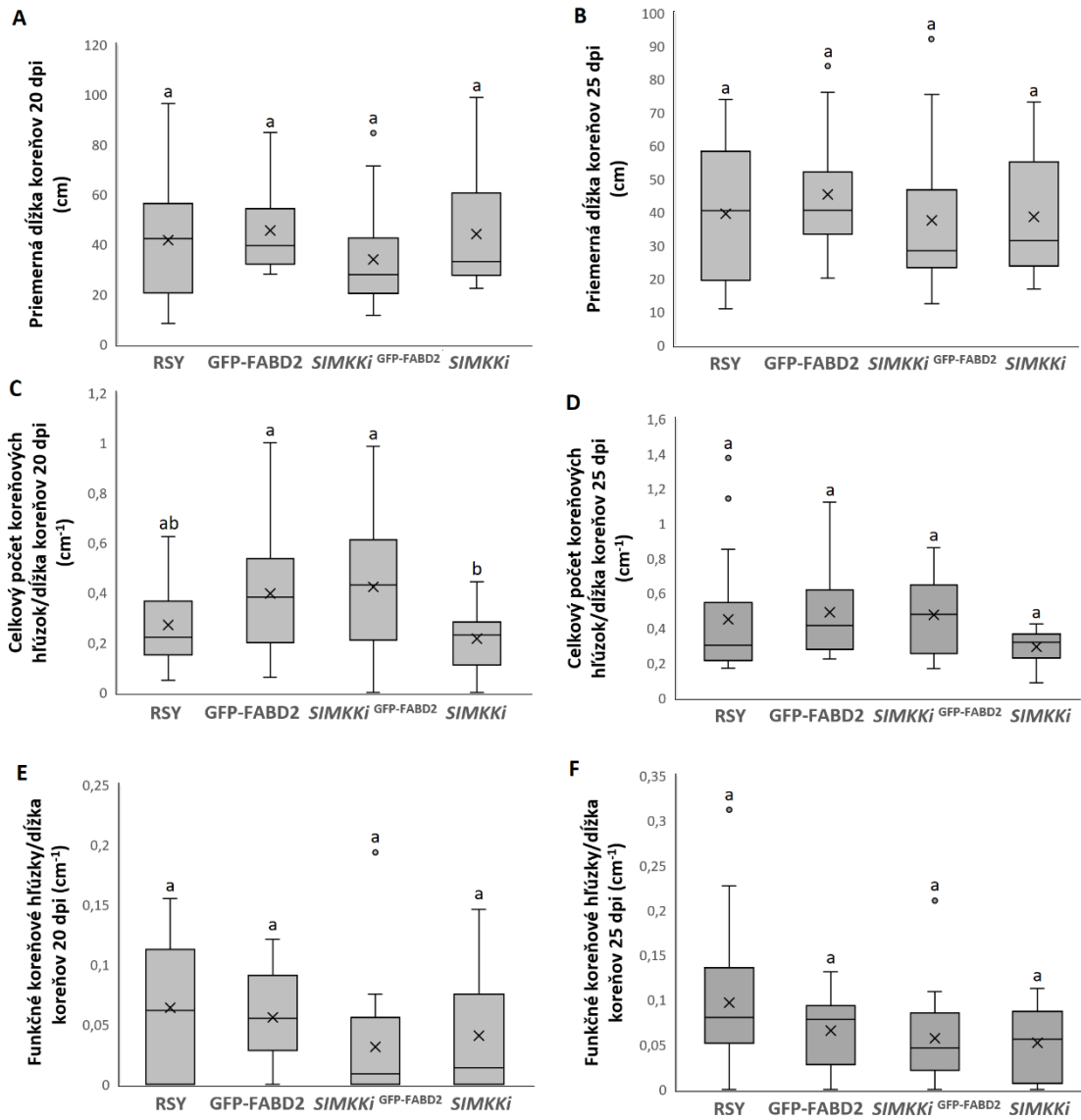
Tvorba infekčných vlákien bola kvantitatívne vyhodnotená v 6. a 11. deň po inokulácii (dpi) so *S. meliloti* na Fahræus médiu bez dusíka ako počet infekčných vlákien na dĺžku celého koreňového systému (Obr. 11). Dĺžka koreňových systémov jednotlivých rastlín bola zmeraná v programe ImageJ zo snímok rastlín na Petriho miskách snímaných pomocou stolového skenera v deň počítania infekčných vlákien. Na kvantitatívnu analýzu tvorby infekčných vlákien u jednotlivých línií *M. sativa* bolo použitých 9-11 biologických replík v 6. dpi so *S. meliloti* (N=9 pre RSY; N=10 pre GFP-FABD2 líniu; N=9 pre *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} líniu, N=11 pre *SIMKK-RNAi* líniu) a 8-12 biologických replík v 11. dpi (N=9 pre RSY; N=10 pre GFP-FABD2 líniu; N=12 pre *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} líniu; N=8 pre *SIMKK-RNAi* líniu). Kvôli časovo náročnému počítaniu infekčných vlákien a rýchlemu prírastku dĺžky koreňových systémov rastlín nebolo možné spočítať infekčné vlákna u rovnakých rastlinách pri 6. a 11. dpi so *S. meliloti*. Transgénná línia *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} mala počas 6. a 11. dpi so *S. meliloti* najmenšiu priemernú dĺžku koreňovej systému, ale tento rozdiel nebol štatisticky významný oproti ostatným líniám (Obr. 11A, B). Počet infekčných vlákien na dĺžku koreňového systému bol v priebehu kokultivácie najnižší u transgénnnej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} so zníženou expresiou proteínu SIMK a SIMKK, ktorá oproti transgénnnej línií GFP-FABD2 ukázala štatistický signifikantný rozdiel ($P < 0,05$) pri 6. dpi so *S. meliloti* (Obr. 11C). Transgénná línia *SIMKK-RNAi* mala oproti líniám RSY a GFP-FABD2 v priebehu kokultivácie so *S. meliloti* taktiež znížený počet infekčných vlákien na dĺžku koreňového systému, ale štatisticky významný rozdiel nebol preukázaný. Počet infekčných vlákien na dĺžku koreňového systému v 6. a 11. dpi so *S. meliloti* medzi líniami RSY a GFP-FABD2 bol relatívne podobný (Obr. 11C, D).

Efektívnosť tvorby koreňových hlúčok bola kvantitatívne vyhodnotená v 20. a 25. deň po inokulácii so *S. meliloti* ako celkový počet koreňových hlúčok a aj ako počet funkčných koreňových hlúčok na dĺžku koreňového systému (Obr. 12). Dĺžka koreňových systémov jednotlivých rastlín bola zmeraná v programe ImageJ zo snímok rastlín na Petriho miskách snímaných pomocou stolového skenera v deň počítania koreňových hlúčok. Na kvantitatívnu analýzu tvorby koreňových hlúčok u jednotlivých línií *M. sativa* bolo použitých 12-21 biologických replík v 20. dpi so *S. meliloti* (N=18 pre RSY; N=21 pre GFP-FABD2 líniu; N=20 pre *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} líniu,

N=12 pre *SIMKK-RNAi* líniu) a 9-20 biologických replík v 11. dpi (N=20 pre RSY; N=16 pre GFP-FABD2 líniu; N=19 pre *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} líniu; N=9 pre *SIMKK-RNAi* líniu). Nebol pozorovaný žiadny významný rozdiel v priemernej dĺžke koreňového systému medzi štyrmi príslušnými líniami pri 20. a 25 dpi. so *S. meliloti*. V priebehu kokultivácie rastlín *M. sativa* vykazovala transgénná línia *SIMKK-RNAi* najmenší celkový počet koreňových hlúčok, ktorý bol oproti líniam GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} signifikantne rozdielny ($P < 0,05$) pri 20. dpi (Obr. 12C). Pozoruhodným zistením je, že dvojitá transgénná línia *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} vytvárala podobné množstvo koreňových hlúčok na dĺžku koreňového systému ako línia GFP-FABD2 pri 20. a 25. dpi (Obr. C,D). Kontrolná línia RSY mala oproti transgénnym líniam najväčší počet funkčných koreňových hlúčok, ale tento rozdiel nebol signifikantne preukázaný (Obr. 12E, F). U transgénnych línii *SIMKK-RNAi* a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} bol počet funkčných koreňových hlúčok najnižší a viacero rastlín z týchto transgénnych línii nevytvorilo žiadne funkčné koreňové hlúčky pri 20. dpi (Obr. 12E).



Obrázok 11. Efektívnosť tvorby infekčných vlákien (ITs) u kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* 6. a 11. deň po inokulácii (dpi) so *S. meliloti*. (A, B) Priemerná dĺžka koreňov a (C, D) počet ITs na dĺžku celého koreňového systému (A, C) 6. dpi so *S. meliloti* u *M. sativa* kontrolnej línie RSY (N=9) a u transgénnych línií GFP-FABD2 (N=10), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (*SIMKKi*^{GFP-FABD2}, N=9), *SIMKK-RNAi* (*SIMKKi*, N=11) a (B, D) 11. dpi so *S. meliloti* u *M. sativa* kontrolnej línie RSY (N=9) a u transgénnych línií GFP-FABD2 (N=10), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (N=12), *SIMKK-RNAi* (N=8). Krabicové grafy zobrazujú prvý a tretí kvartil, ktoré sú rozdelené podľa mediánu. Krížiky označujú priemerné hodnoty a fúzy zahŕňajú maximálne a minimálne hodnoty. Rôzne malé písmená indikujú štatistickú preukaznosť rozdielov medzi líniami podľa jednosmernej ANOVA analýzy a následného post-hoc Tukey HSD testu ($P < 0,05$). Chybové úsečky zobrazujú \pm SD.

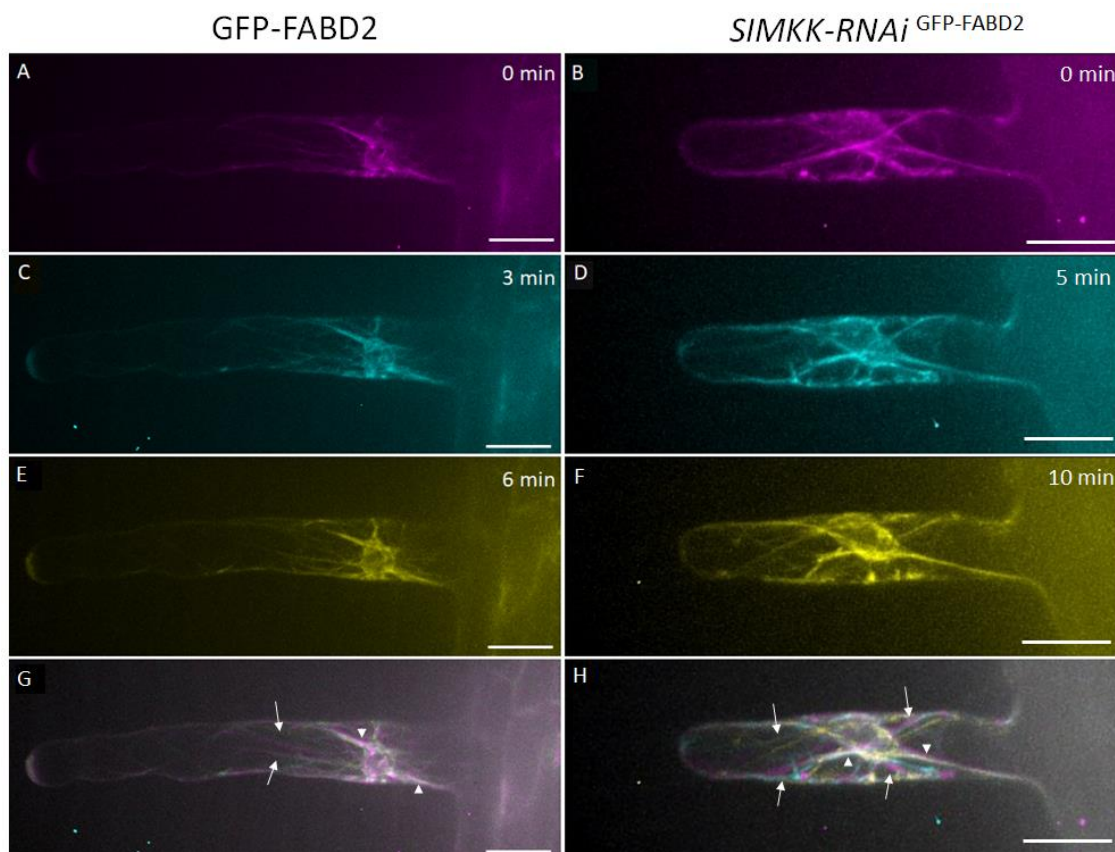


Obrázok 12. Efektívnosť tvorby koreňových hlúčok u kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* 20. a 25. deň po inokulácii (dpi) so *S. meliloti*. (A, B) Priemerná dĺžka koreňov, (C, D) celkový počet koreňových hlúčok a (E, F) počet funkčných koreňových hlúčok na dĺžku celého koreňového systému (A, C, E) 20. dpi so *S. meliloti* v *M. sativa* kontrolnej línie RSY (N=18) a u transgénnych línií GFP-FABD2 (N=21), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (*SIMKKi*^{GFP-FABD2}, N=22), *SIMKK-RNAi* (*SIMKKi*, N=12) a (B, D, F) 25. dpi so *S. meliloti* u *M. sativa* kontrolnej línie RSY (N=20) a v transgénnych línií GFP-FABD2 (N=16), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (N=19), *SIMKK-RNAi* (N=9). Krabicové grafy zobrazujú prvý a tretí kvartil, ktoré sú rozdelené podľa mediánu. Krížiky označujú priemerné hodnoty a fúzy zahŕňajú maximálne a minimálne hodnoty. Rôzne malé písmená indikujú štatistickú preukaznosť rozdielov medzi líniami podľa jednosmernej ANOVA analýzy a následného post-hoc Tukey HSD testu ($P < 0,05$). Chybové úsečky zobrazujú \pm SD.

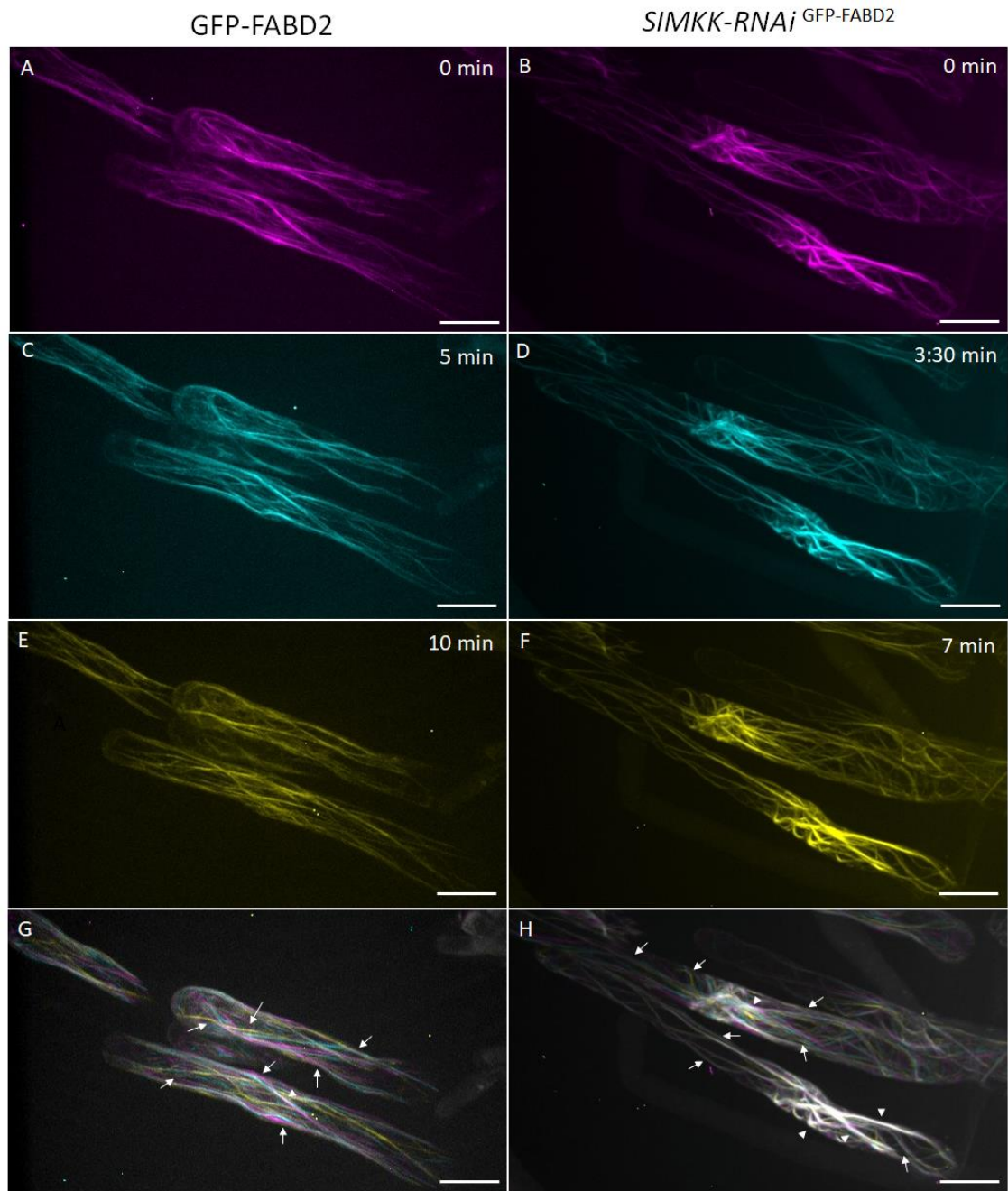
4.4 Mikroskopická analýza aktínového cytoskeletu v koreňových vláskoch rastlín *M. sativa*

Na mikroskopickú dokumentáciu organizácie, štruktúry a dynamiky aktínového cytoskeletu v koreňových vláskoch boli vybrané rastliny *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} s fluorescenčne značeným aktínovým cytoskeletom z „mokrej“ kontroly, rastúce na Fahræus médiu bez dusíka. Tieto rastliny teda reprezentovali kontrolné podmienky bez baktérii *S. meliloti*. Rastliny *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 slúžili ako kontrola ku dvojitej transgéennej línii *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Na prípravu preparátov boli vybrané korene rastlín s najvyšším fluorescenčným signálom GFP. Pripravené preparáty boli snímané pomocou konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom s využitím 488 laseru na detekciu GFP signálu (excitácia pri 488 nm, emisné maximum pri 509 nm). Na mikroskopickú analýzu boli vybrané aj rastúce, ale aj dospelé nerastúce koreňové vlásy. Pre stanovenie a vyhodnotenie dynamiky aktínového cytoskeletu boli využité časové úseky zo snímania u rastúcich koreňových vláskov na začiatku (0 min), v strede (3 min/5 min) a pri konci snímania (6 min/10 min) a u dospelých koreňových vláskov na začiatku (0 min), v strede (5 min/3:30 min) a pri konci snímania (10 min/7 min). Pre každý časový interval bol fluorescenčný signál aktínového cytoskeletu označený inou farbou (magenta pre začiatok, cyanová pre stred a žltá pre koniec snímania). Snímky boli pomocou programu ImageJ prekryté a spojené do jedného obrázku. Aktínové vlákna, ktoré sú na spojenom obrázku označené rôznou farbou, sa neprekrývajú, čo jednoznačne naznačuje, že boli dynamické (na obrázku vyznačené šípkami). Aktínové vlákna, ktoré boli statické, sa na spojenom obrázku v dôsledku prekrytia farieb javili ako biele (na obrázku vyznačené hrotmi). Medzi transgéennymi líniami GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} sa ukázali malé rozdiely v štruktúre a dynamike aktínového cytoskeletu. V rastúcich koreňových vláskoch u obidvoch línii *M. sativa* sa nachádzali dobre definované aktínové zväzky okolo jadier, zaisťujúce pohyb jadra v koreňových vláskoch. Hrubé aktínové zväzky vychádzajúce z pozície jadra boli statické u obidvoch línii. Pozdĺžne dynamické zväzky aktínových vlákien smerujúce ku špičke koreňového vlásku boli u línie GFP-FABD2 v subapikálnej oblasti málo viditeľné, pričom v špičke rastúceho koreňového vlásku dlhé zväzky chýbali a nachádzal sa v ňom difúzny signál. Oproti tomu u línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} dynamické pozdĺžne aktínové vlákna prechádzali koreňovým vláskom až ku špičke. V dospelých nerastúcich koreňových vláskoch sa nachádzali dynamické aktínové

zvázky s pozdĺžnou orientáciou u oboch línií, ktoré prechádzali perifériou koreňového vlásku a celou špičkou koreňového vlásku. U transgénej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} boli viditeľné hrubé aktínové zvázky vychádzajúce z oblasti jadra, ktoré boli menej dynamické.



Obrázok 13. Časové intervaly a ich prekryv pri snímaní aktínového cytoskeletu rastúcich koreňových vlásokov *M. sativa* (A, C, E, G) transgénej línie GFP-FABD2 a (B, D, F, H) dvojitej transgénej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. (A, B) Začiatok snímania, (C, D) stred snímania, (E, F) koniec snímania, (G, H) prekryv časových snímok. Šípky ukazujú dynamické aktínové vlákna a hroty označujú statické aktínové vlákna. Mierky = 20 μ m.



Obrázok 14. Časové intervaly a ich prekryv pri snímaní aktínového cytoskeletu v dospelých nerastúcich koreňových vláskoch *M. sativa* (A, C, E, G) transgénnej línie GFP-FABD2 a (B, D, F, H) dvojitej transgénnej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Šípky ukazujú dynamické aktínové vlákna a hroty označujú statické aktínové vlákna. (A, B) Začiatok snímania, (C, D) stred snímania, (E, F) koniec snímania, (G, H) prekryv časových snímok. Mierky = 20 μ m.

4.5 Mikroskopická dokumentácia symbiotických interakcií rastlín *M. sativa* so *S. meliloti*

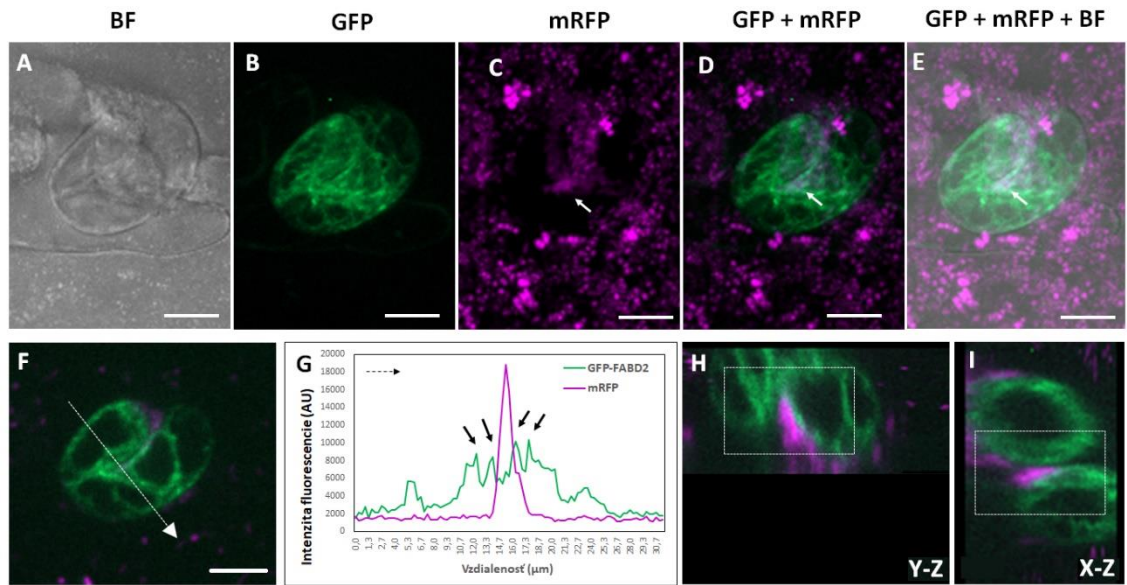
Na mikroskopickú dokumentáciu symbiotických procesov v koreňových bunkách rastlín *M. sativa* po aplikácii *S. meliloti* s produkciou fluorescenčného proteínu mRFP boli použité transgénne línie GFP-FABD2, *SIMKK RNAi*^{GFP-FABD2}, *SIMKK-RNAi* a kontrolná línia RSY. Transgénne línie s produkciou fluorescenčného markeru GFP-FABD2 slúžili na charakterizáciu štruktúrnych zmien, organizácie a dynamiky aktínového cytoskeletu počas skorých symbiotických procesov. Príprava preparátov z odrezkov koreňov a sledovanie symbiotických interakcií prebiehalo v rozmedzí 3 až 18 dní po aplikácii *S. meliloti*. Snímanie pripravených preparátov prebiehalo pomocou konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom s využitím laseru 488 nm na detekciu signálu GFP (excitácia pri 488 nm, emisné maximum pri 509 nm) a laseru 561 nm na detekciu fluorescenčne značených baktérií *S. meliloti* (excitácia pri 561 nm, emisné maximum pri 612 nm) a pri použití objektívu so zväčšením 40x. Červený signál mRFP baktérií *S. meliloti* bol počas vyhotovenia snímok konvertovaný na fialovú farbu. Reprezentatívne snímky a boli doplnené zobrazené spojením Z roviny pomocou funkcie ortológnej projekcie, a zobrazením X-Z a Y-Z pohľadov. Príprava a vyhodnotenie týchto údajov prebehla podľa postupu publikovaného v Hlaváčková *et al.* (2023b). Získané údaje boli taktiež vyhodnotené pomocou profilových meraní na štúdium lineárnej distribúcie signálu fluorescencie GFP-FABD2. Pre stanovenie dynamiky aktínového cytoskeletu boli použité časové úseky zo snímania koreňových vláskov v interakcií s rhizóbiami na začiatku, v strede a pri konci snímania. V každom časovom intervale bol fluorescenčný signál GFP označený inou farbou (magenta pre začiatok, cyanová pre stred a žltá pre koniec snímania), z ktorých bol vytvorený prekryv časových snímok.

Rastliny *M. sativa* reagovali na prítomnosť prichytených baktérií *S. meliloti* zmenou orientácie rastu a deformáciou koreňových vláskov. V zakrútenom koreňovom vlásku transgénnej línie GFP-FABD2 v čase 3 dní po aplikácii *S. meliloti*, teda keď boli baktérie prichytené bunkovou stenou v mieste zatočenia, boli viditeľné cytoplazmatické vlákna vyplnené aktínovými zväzkami, ktoré prechádzali až ku špičke koreňového vlásku (Obr. 15 A-E). Pomocou prekryvu časových snímok bolo možné určiť, že táto sieť aktínových zväzkov bola dynamická (Obr. 16). U transgénnej línie GFP-FABD2 bol v zakrútenom koreňovom vlásku 7 dní po aplikácii *S. meliloti* viditeľný pohyb jadra k smerom k miestu prichytenia rhizóbií (Obr. 17A-E; Video 1, Prílohy). V tomto zakrútenom vlásku boli

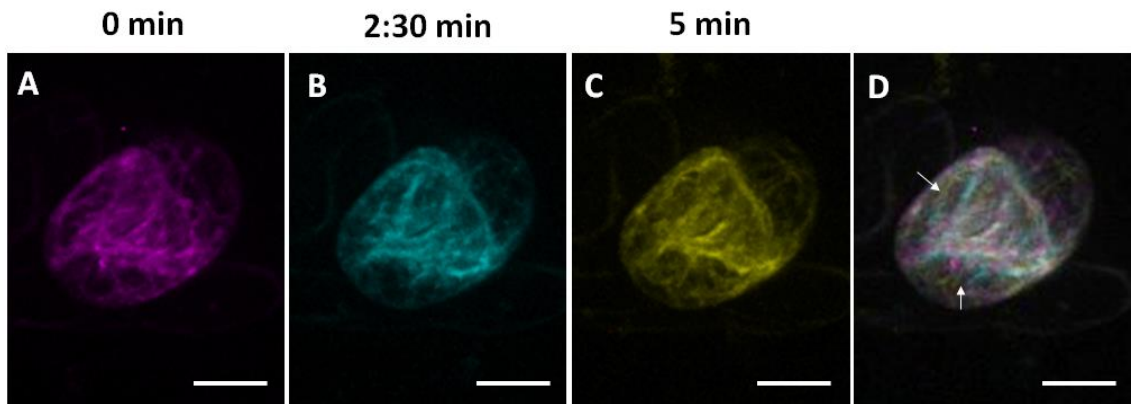
viditeľné pozdĺžne aktínové vlákna, hrubšie aktínové zväzky obklopujúce oblasť jadra a zvýšený fluorescenčný signál GFP-FABD2 v mieste internalizácie rhizóbií. Profilové meranie distribúcie intenzity fluorescencie GFP-FABD2 ukázalo zvýšenú intenzitu signálu GFP-FABD2 v miestach blízkeho kontaktu prichytených rhizóbií (Obr. 15F, G; 17F, G). Okrem toho, vďaka X-Z a Y-Z pohľadom bolo možné vidieť kolóniu rhizóbií v kontakte s koreňovým vláskom a miesto iniciácie tvorby infekčného vaku (Obr. 15H, I; 17H, I).

Pozdĺžne aktínové zväzky boli taktiež pozorované v zakrútenom koreňovom vlásku u transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} s prichytenými rhizóbiami 7 dní po aplikácii. Pomocou prekryvu časových snímok bola porovnaná dynamika aktínového cytoskeletu v zakrútených koreňových vláskoch transgénnych línií GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 19). U oboch línií boli aktínové vlákna prechádzajúce zakrútenými koreňovými vláskami dynamické.

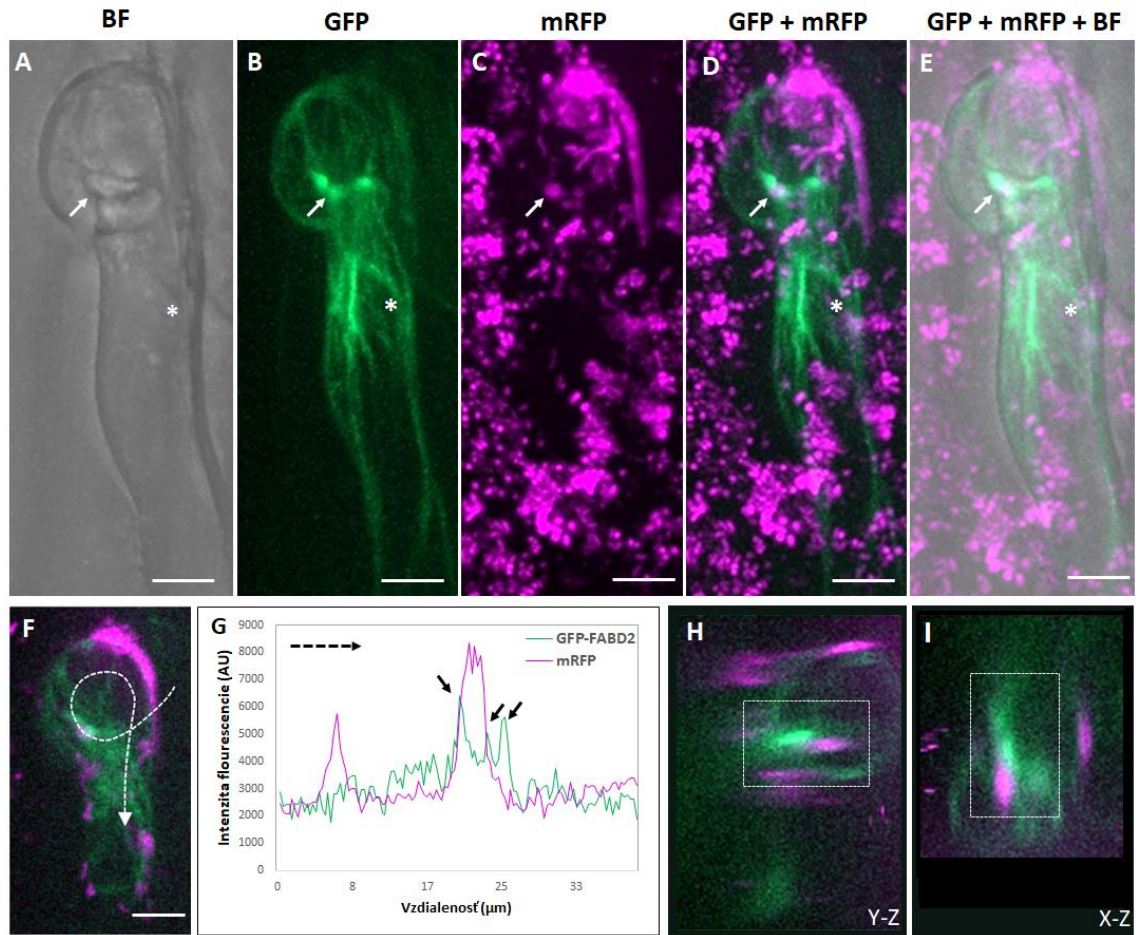
Po iniciácii tvorby infekčných váčkov sa rhizobia vo vnútri týchto štruktúr delili a vytvárali kolónie, z ktorých po čase dochádzalo k tvorbe infekčných vláskien. Tvorba infekčného vlákna bola pozorovaná u transgéennej línie GFP-FABD2 už 4 dni po aplikácii *S. meliloti* (Obr. 20 A-E). Pomocou distribúcie intenzity fluorescencie bola viditeľná zvýšená intenzita signálu GFP-FABD2 v mieste prieniku rhizóbií do infekčného vlákna a v mieste tvoriaceho sa infekčného vlákna (Obr. 20 F, G, J, K). Pohľady z X-Z a Y-Z rovín zobrazujú vytvárajúce sa infekčné vlákno a miesto vstupu rhizóbií do infekčného vlákna (Obr. 20H, I, L, M). Infekčné vlákna sa ďalej predlžovali koreňovými vláskami smerom ku základni epidermálnej bunky (trichoplastu). U transgénnych línií GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} boli pozorované dynamické aktínové zväzky pozdĺž predlžujúcich sa infekčných vláskien (Obr. 21, 22; Video 2, 3, Prílohy). V oblasti infekčného vlákna sa pomocou distribúcie intenzity fluorescencie zistila zvýšená intenzita GFP-FABD2 signálu. Pomocou pohľadu z X-Z roviny je možný vidieť prierez infekčného vlákna, okolo ktorého sa nachádzali aktínové vlákna (Obr. 21, 22). Infekčné vlákna následne prerastali epidermálnymi bunkami do koreňovej kôry (Obr. 23). Kvôli slabej rozlišovacej schopnosti mikroskopu v hlbších vrstvách hrubých koreňov *M. sativa* a slabšej intenzite fluorescenčného signálu nebola zistená štruktúra a usporiadanie aktínového cytoskeletu v kortikálnych bunkách a preto nebolo vykonané porovnanie tohto parametru medzi transgénymi líniami s produkciou GFP-FABD2 proteínu.



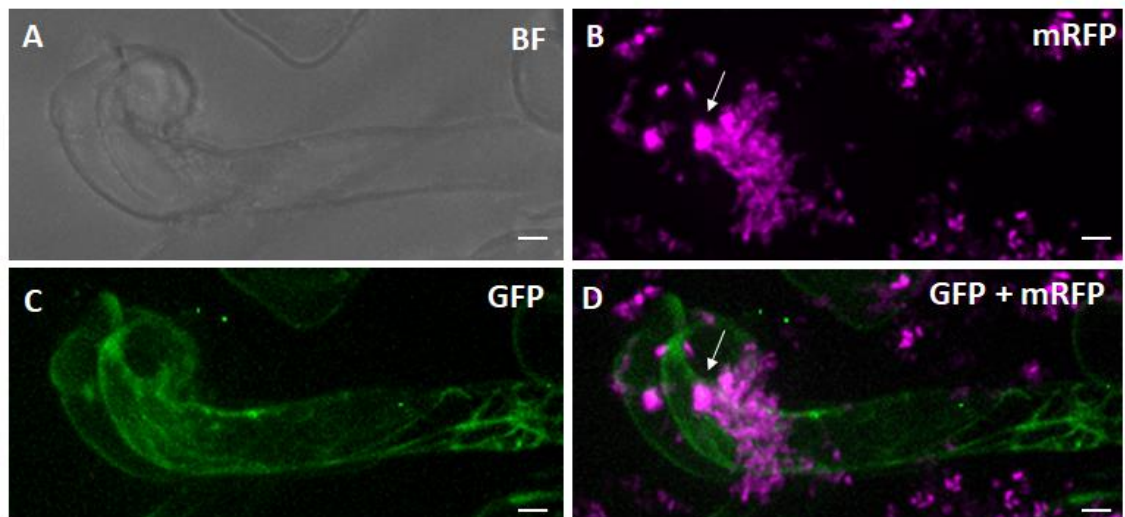
Obrázok 15. Zakrútený koreňový vlások rastliny *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2, 3 dni po aplikácii *S. meliloti* s produkciou mRFP. Snímky sú zobrazené (A) v prechádzajúcom svetle (BF), (B) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (C) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (D, F) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP, a (E) ako prekryv prechádzajúceho svetla (BF) a fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. (F, G) Distribúcia intenzity fluorescencie (G) v smere prerušovanej šípky na (F). (H) Y-Z a (I) X-Z pohľady. Biele šípky (C-E) označujú miesto prichytenia rhizóbií. Čierne šípky (G) označujú zvýšenú intenzitu GFP-FABD2 signálu. Mierky = 10 µm.



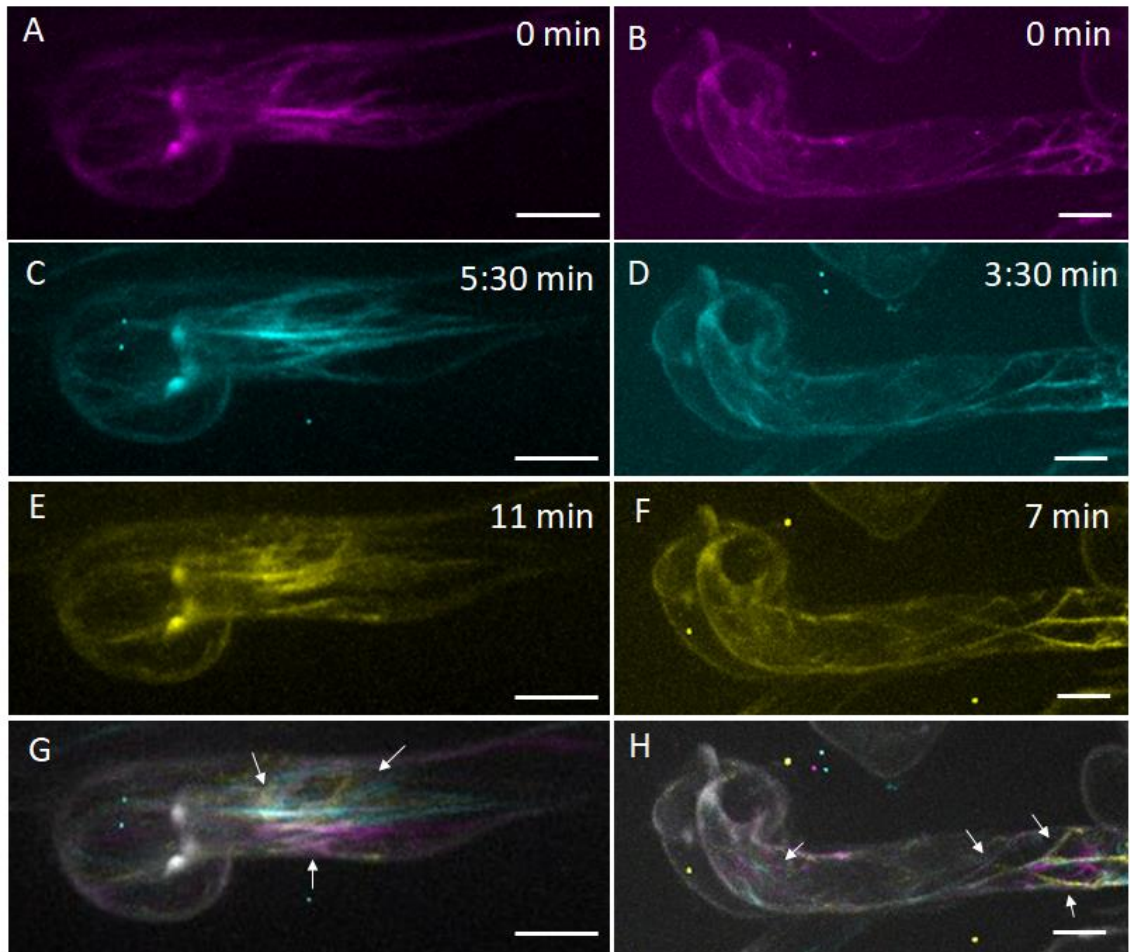
Obrázok 16. Časové intervaly a ich prekryv pri snímaní aktínového cytoskeletu v zakrútenom koreňovom vlásku *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 v čase 3 dní po aplikácii *S. meliloti*. (A) Začiatok snímania, (B) stred snímania, (C) koniec snímania, (D) prekryv časových snímok. Šípky označujú dynamické aktínové vlákna. Mierky = 10 µm.



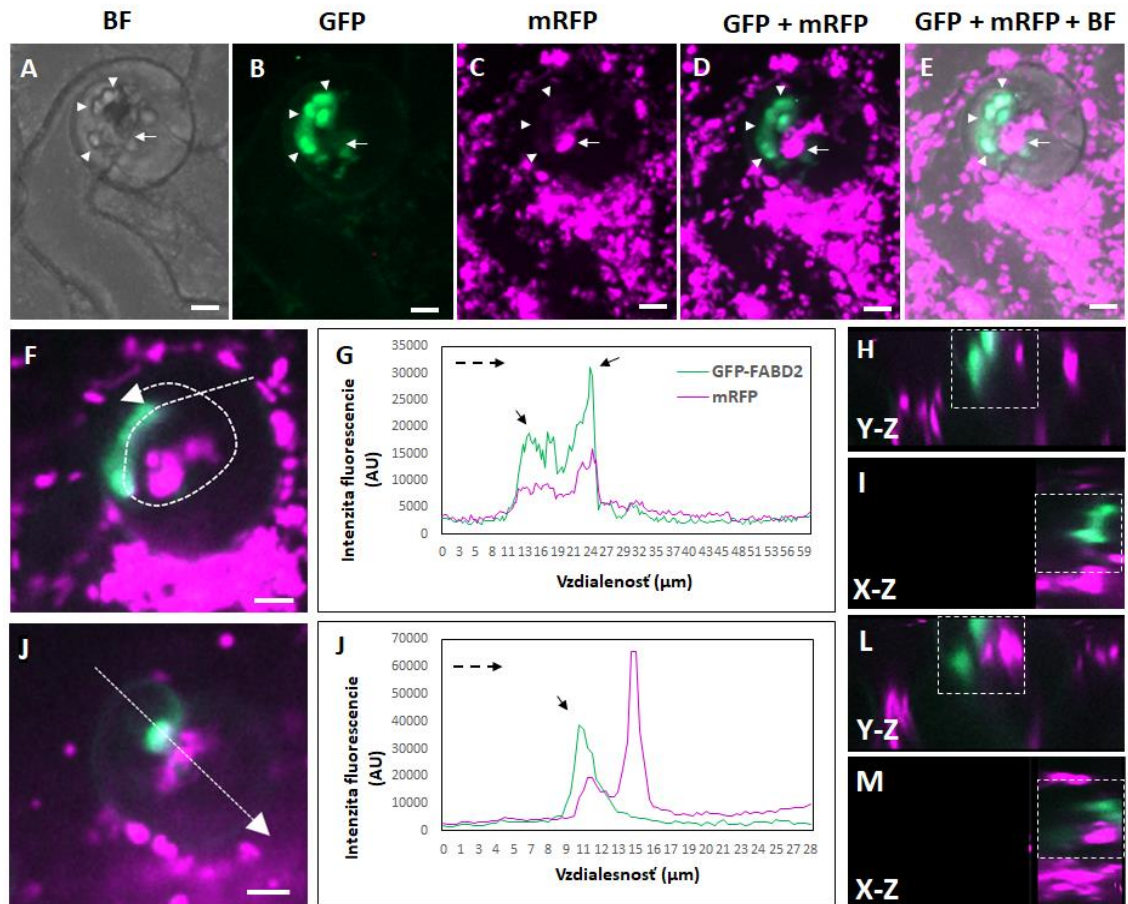
Obrázok 17. Zakrútený koreňový vlasok rastliny *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2, 7 dní po aplikácii *S. meliloti* s produkciou mRFP. Snímky sú zobrazené (A) v prechádzajúcom svetle (BF), (B) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (C) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (D, F) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP a (E) ako prekryv prechádzajúceho svetla (BF) a fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. (G) Distribúcia intenzity fluorescence v smere prerušovanej šípky v (F). (H) Y-Z a (I) X-Z pohľady. Biele šípky (A-E) označujú miesto prichytenia rhizóbií. Čierne šípky (G) označujú zvýšenú intenzitu GFP-FABD2 signálu. Hviezdičkou je označené jadro (A-E). Mierky = 10 μm .



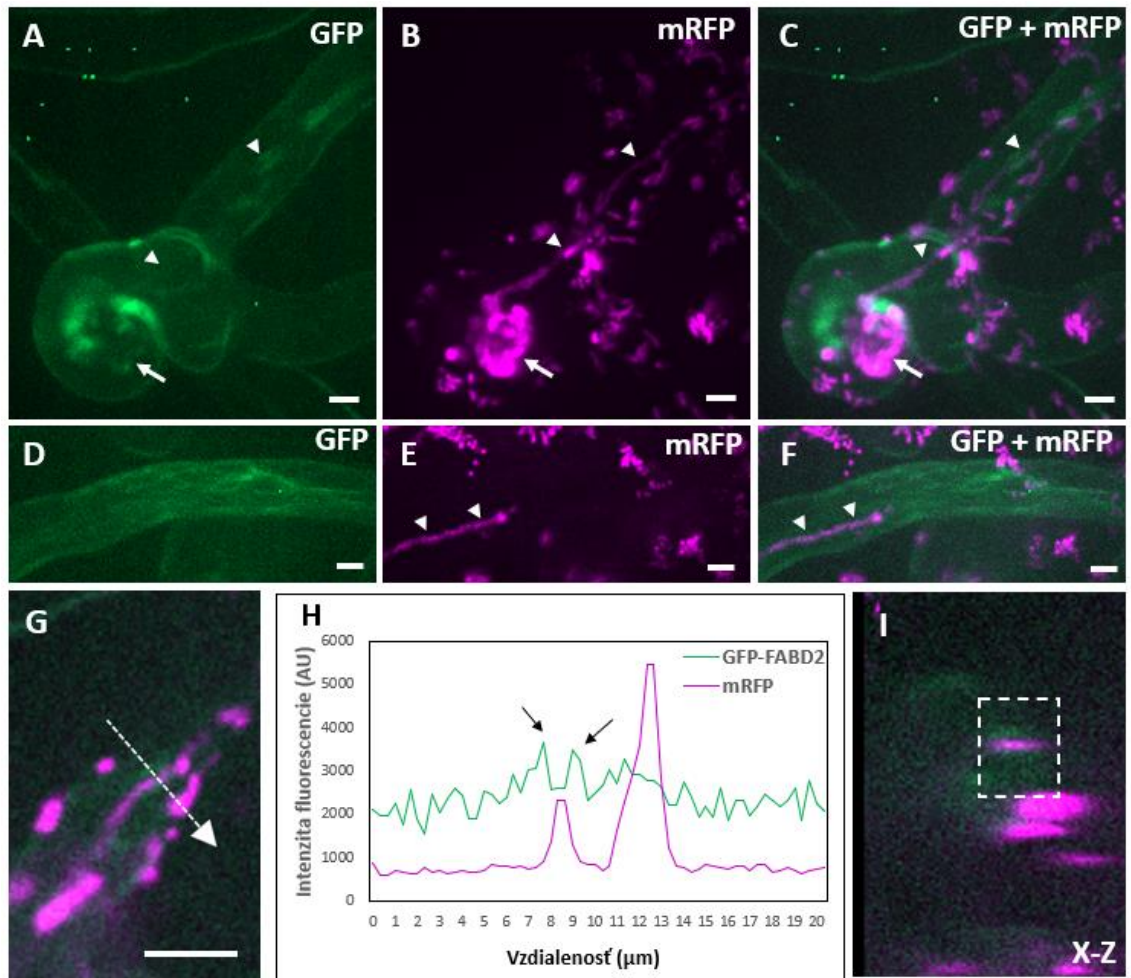
Obrázok 18. Zakrútený koreňový vlások rastliny *M. sativa* transgénnej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, 7 dní po aplikácii *S. meliloti* s produkciou mRFP. Snímky sú zobrazené (A) v prechádzajúcom svetle (BF), (B) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (C) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP a (D) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. Biele šípky (B, D) ukazujú na miesto prichytenia rhizóbií. Mierka = 5 μ m.



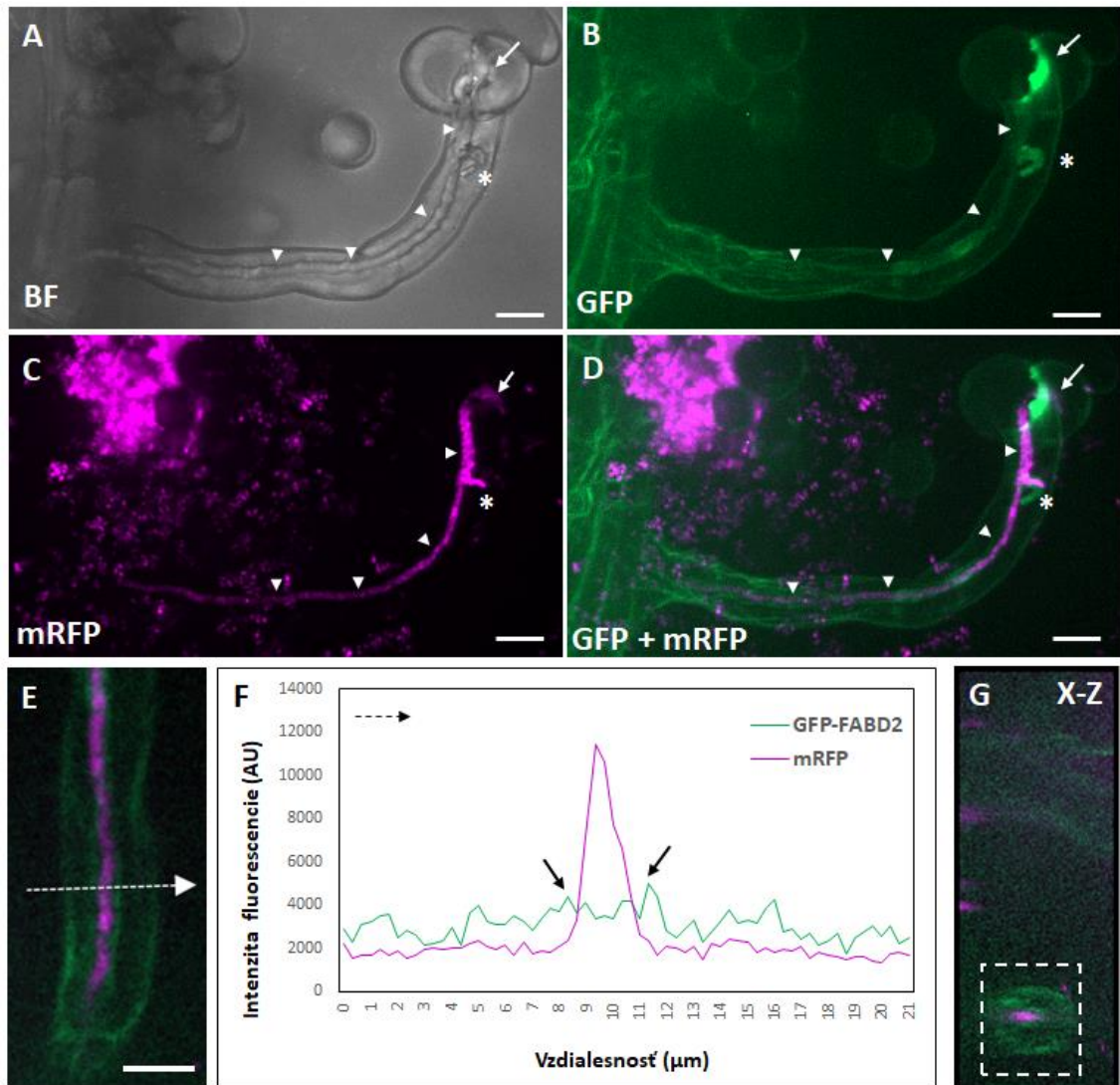
Obrázok 19. Časové intervaly a ich prekryv pri snímaní aktínového cytoskeletu v zakrútenom koreňovom vlásku *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, 3 dni po aplikácii *S. meliloti*. (A, B) Začiatok snímania, (C, D) stred snímania, (E, F) koniec snímania a (G, H) prekryv časových snímok. Šípky ukazujú dynamické aktínové vlákna. Mierky = 10 μm.



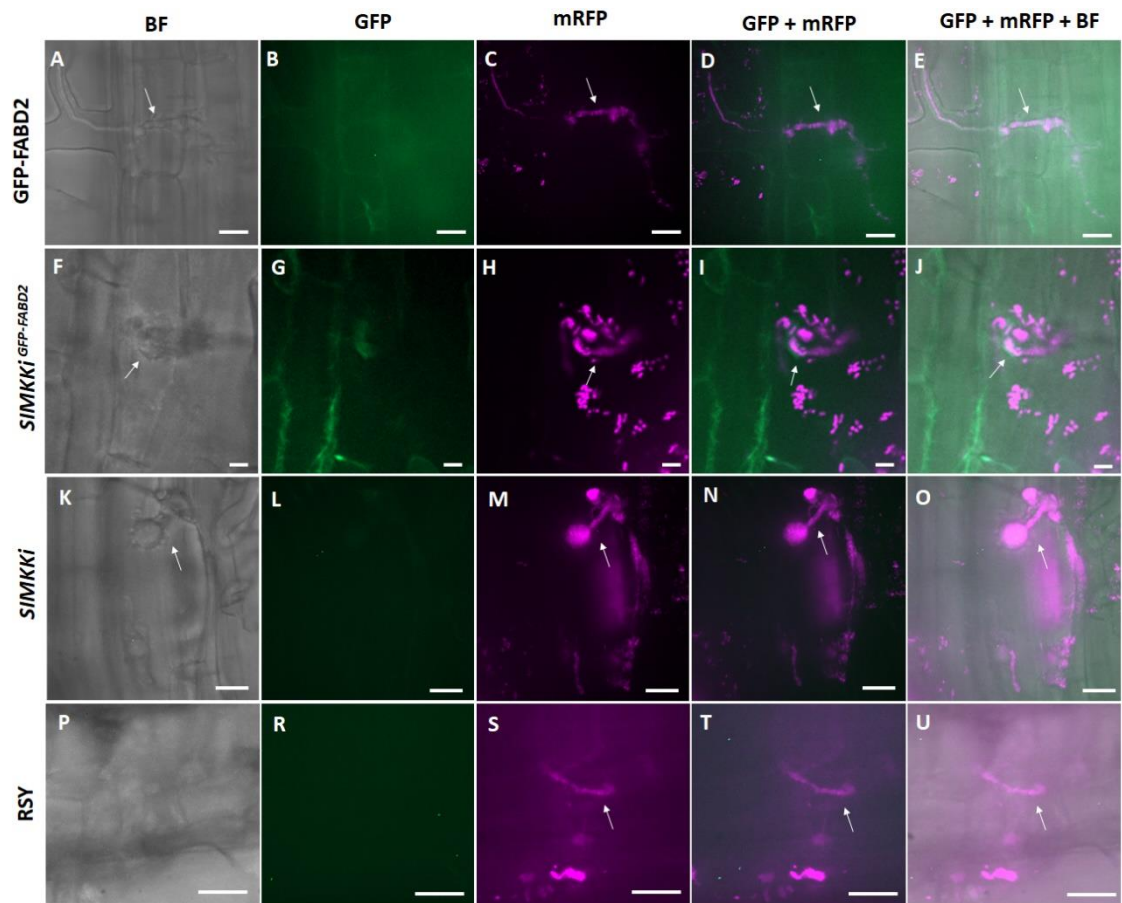
Obrázok 20. Tvorba infekčného vlákna v koreňovom vlásku rastliny *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2, 4 dni po aplikácii *S. meliloti* s produkciou mRFP. Snímky sú zobrazené (A) v prechádzajúcom svetle (BF), (B) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (C) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (D, F, J) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP a (E) ako prekryv prechádzajúceho svetla (BF) a fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. (G, K) Distribúcia intenzity fluorescence v smere prerušovanej šípky v (F, J). (H, L) Y-Z a (I, M) X-Z pohľady. Biela šípka (A - E) označuje infekčný váčok. Hroty (A - E) označujú tvoriace sa infekčné vlákno. Čierne šípky (G, K) označujú zvýšenú intenzitu GFP-FABD2 signálu. Mierky = 5 μm .



Obrázok. 21 Predlžujúce sa infekčné vlákno v koreňovom vlásku rastliny *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2, 10 dní po aplikácii *S. meliloti* s produkciou mRFP. Snímky sú zobrazené (A, D) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B, E) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, a (C, F) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. (H) Distribúcia intenzity fluorescence v smere prerušovanej šípky v (G). (I) X-Z pohľad. Biele šípky (A-C) označujú infekčný váčok. Hroty (A, B, C, D, E, F) označujú predlžujúce sa infekčné vlákno. Čierne šípky (H) označujú zvýšenú intenzitu GFP-FABD2 signálu. (A, B, C, D, E, F) Mierky = 5 μm ; (G) Mierka = 10 μm .



Obrázok 22. Predlžujúce sa infekčné vlákno v koreňovom vlásku rastliny *M. sativa* transgéennej línie *SIMKK-RNAi^{GFP-FABD2}*, 10 dní po aplikácii *S. meliloti* s produkciou mRFP. Snímky sú zobrazené (A) v prechádzajúcom svetle (BF), (B) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (C) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, a (D, E) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. (F) Distribúcia intenzity fluorescence v smere prerušovanej šípky v (E). (G) X-Z pohľad. Biele šípky (A-D) označujú infekčný váčok. Hroty (A-D) označujú predlžujúce sa infekčné vlákno. Hviezdička (A-D) označuje novo vytvárajúce sa infekčné vlákno. Čierne šípky (F) označujú zvýšenú intenzitu GFP-FABD2 signálu. Mierky = 10 μm .



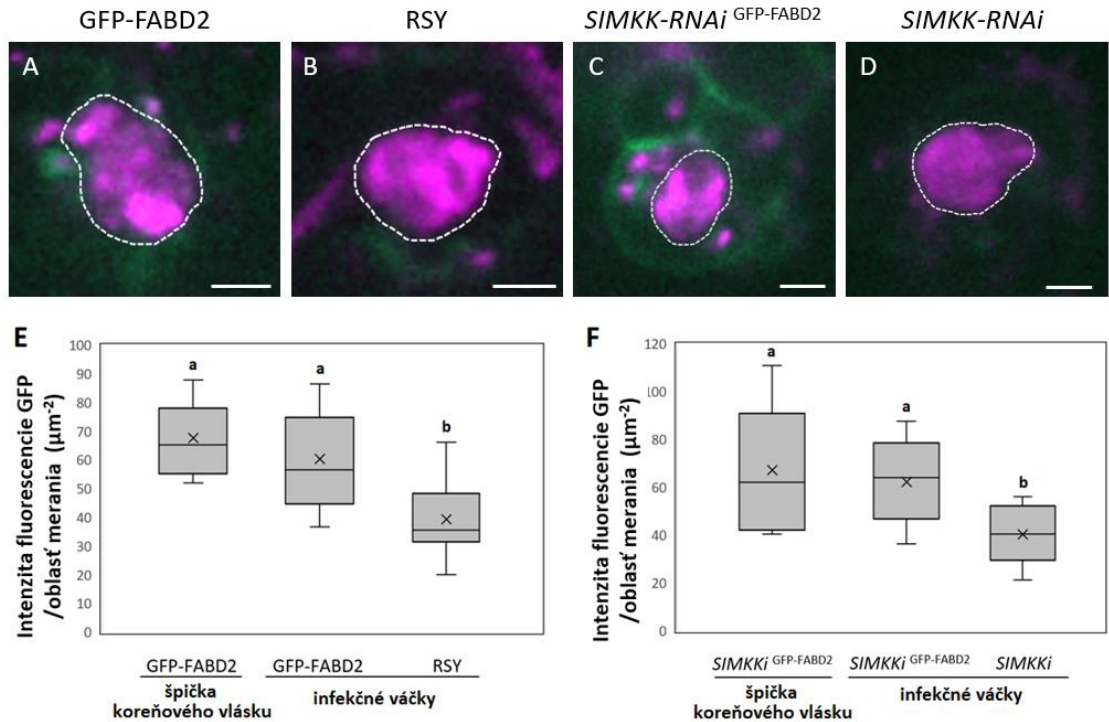
Obrázok 23. Infekčné vlákna prerastajúce epidermálnymi bunkami rastlín *M. sativa* u kontrolnej línie RSY (12 dpi), transgénnych línií GFP-FABD2 (10dpi), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (*SIMKK1*^{GFP-FABD2}, 10dpi) a *SIMKK-RNAi* (*SIMKK1*, 8 dpi). Snímky sú zobrazené (A, F, K, P) v prechádzajúcom svetle (BF), (B, G, L, R) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (C, H, M, S) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (D, I, N, T) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP, (E, J, O, U) a ako prekryv prechádzajúceho svetla (BF) a fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. Šípky označujú infekčné vlákna. Mierky = 5 μ m; (A-E, K-U) Mierky = 20 μ m.

4.5.1 Kvantitatívna analýza distribúcie intenzity fluorescence GFP-FABD2

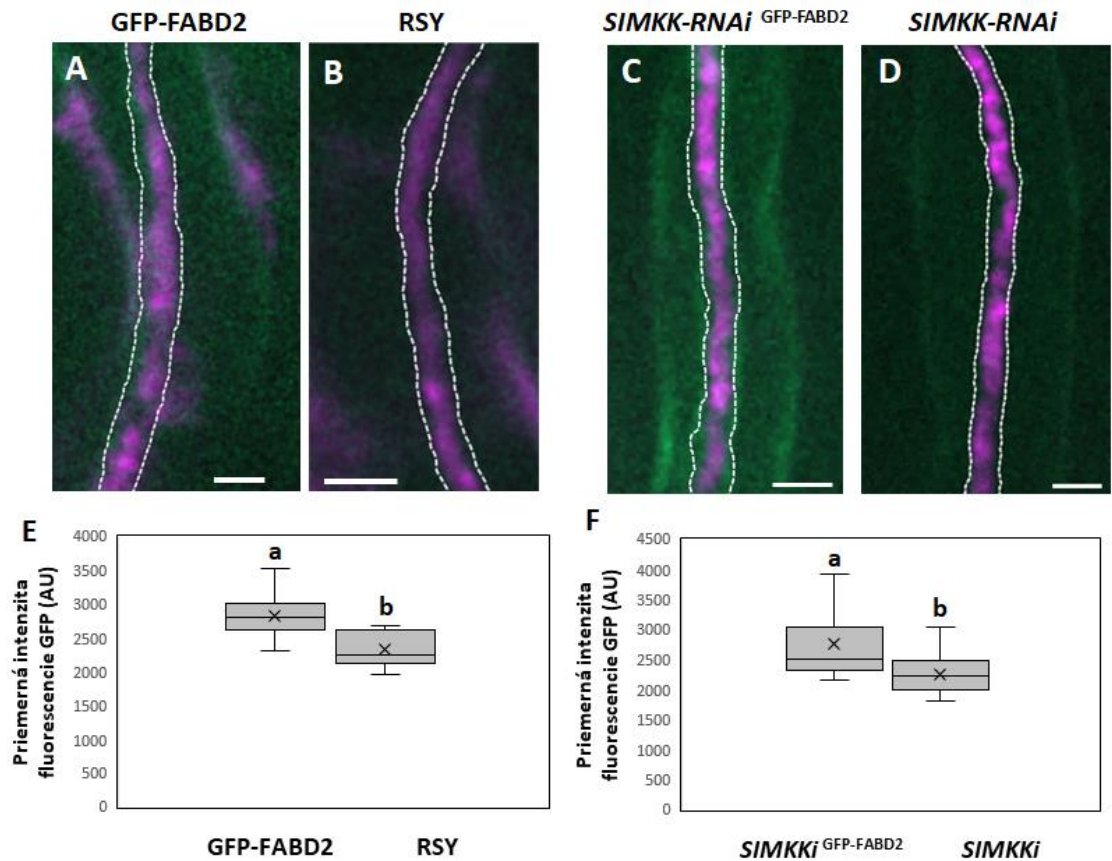
Na vyhodnotenie distribúcie fluorescenčnej intenzity GFP-FABD2 signálu sa kvantitatívne vyhodnotili priemerné intenzity fluorescence intenzity v špecifických oblastiach záujmu v skorých symbiotických štádiách okolo infekčných váčkov a IT (10 – 13 dpi). Vyhotovené snímky z konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom boli vyhotovené za rovnakých podmienok a priemerné intenzity boli merané z jednej konfokálnej roviny. Na kvantitatívnu analýzu distribúcie priemernej intenzity fluorescence v oblasti infekčných váčkov u jednotlivých línii *M. sativa* bolo použitých 9-10 biologických replík pre línie GFP-FABD2 a RSY (N=9 pre infekčné váčky u RSY; N=10 pre infekčné váčky u GFP-FABD2 línie; N=10 pre špičky koreňových vlásokv línie GFP-FABD2 v interakcii so *S. meliloti*) a 10-12 biologických replík pre línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a *SIMKK-RNAi* (N=12 pre infekčné váčky u *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} línie, N=10 infekčných váčkov u *SIMKK-RNAi* línie, N=10 pre špičky koreňových vlásokv línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} v interakcii so *S. meliloti*). Na kvantitatívnu analýzu distribúcie priemernej intenzity fluorescence v oblasti infekčných vlákien u jednotlivých línii *M. sativa* bolo použitých 10-12 biologických replík (N=11 u RSY; N=10 u GFP-FABD2 línie; N=11 *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} línie; N=12 u *SIMKK-RNAi* línie). Línie RSY a *SIMKK-RNAi* boli do meraní zahrnuté ako hodnoty nešpecifického prahového signálu („background“), keďže žiadny proteín označený s GFP neprodukovali.

Priemerné intenzity fluorescence GFP-FABD2 v špecifických oblastiach záujmu okolo infekčných váčkov u GFP-FABD2 línie a špičiek koreňových vlásokv u GFP-FABD2 vykazovali podobné intenzity (Obr. 24E). Oproti tomu priemerné intenzity fluorescence v oblasti infekčných váčkov u kontrolnej línie RSY mali znížené hodnoty intenzít GFP signálu, čo bolo taktiež štatisticky preukazné ($P < 0,05$) (Obr. 24E). U transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} boli priemerné intenzity fluorescence GFP infekčných váčkov a špičiek koreňových vlásokv v podobných hodnotách. Štatistický preukazný rozdiel ($P < 0,05$) bol zistený oproti línii *SIMKK-RNAi*, ktorá mala znížené priemerné intenzity fluorescence GFP (Obr. 24F). Priemerné intenzity fluorescence GFP signálu boli v oblasti infekčných vlákien u línie GFP-FABD2 oproti RSY línii zvýšené, a boli signifikantne rozdielne ($P < 0,05$). U transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} boli priemerné intenzity fluorescence GFP signifikantne vyššie než u *SIMKK-RNAi* línie ($P < 0,05$). Obidve transgéenne línie produkujúce fluorescenčný proteín GFP-FABD2

značiaci aktínový cytoskelet mali v tomto prípade zvýšené intenzity fluorescence GFP v oblastiach infekčných vlákien a infekčných váčkov oproti kontrolným líniam.



Obrázok 24. Kvantitatívna analýza priemerných intenzít fluorescence GFP-FABD2 v oblasti infekčných váčkov a špičiek koreňových vlásokov u kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa*. (A) GFP-FABD2 línia (N=10 pre infekčné váčky; N=10 pre špičky koreňových vlásokov); (B) RSY línia (N=10); $SIMKK-RNAi^{GFP-FABD2}$ línia (N=10 pre infekčné váčky; N=12 pre koreňové vlásky); (D) $SIMKK-RNAi$ (N=10). (E, F) Krabicové grafy zobrazujú prvý a tretí kvartil, ktoré sú rozdelené podľa mediánu. Krížiky označujú priemerné hodnoty a fúzy zahŕňajú maximálne a minimálne hodnoty. Rôzne malé písmená indikujú štatistickú preukaznosť rozdielov medzi líniami podľa jednosmernej ANOVA analýzy a následného post-hoc Tukey HSD testu ($P < 0,05$). Chybové úsečky zobrazujú \pm SD. (A-D) Mierka = 10 μm .



Obrázok 25. Kvantitatívna analýza priemerných intenzít fluorescence GFP-FABD2 v oblasti IT u kontrolných a transgenných rastlín *M. sativa* 10. až 13 deň po inokulácii so *S. meliloti*. (A) GFP-FABD2 línia (N=10); (B) RSY (N=11); *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (N=11); u *SIMKK-RNAi* (N=12). (E, F) Krabicové grafy zobrazujú prvý a tretí kvartil, ktoré sú rozdelené podľa mediánu. Križičky označujú priemerné hodnoty a fúzy zahŕňajú maximálne a minimálne hodnoty. Rôzne malé písmená indikujú štatistickú preukaznosť rozdielov medzi líniami podľa jednosmernej ANOVA analýzy a následného post-hoc Tukey HSD testu ($P < 0,05$). Chybové úsečky zobrazujú \pm SD. (A-D) Mierky = 10 μ m.

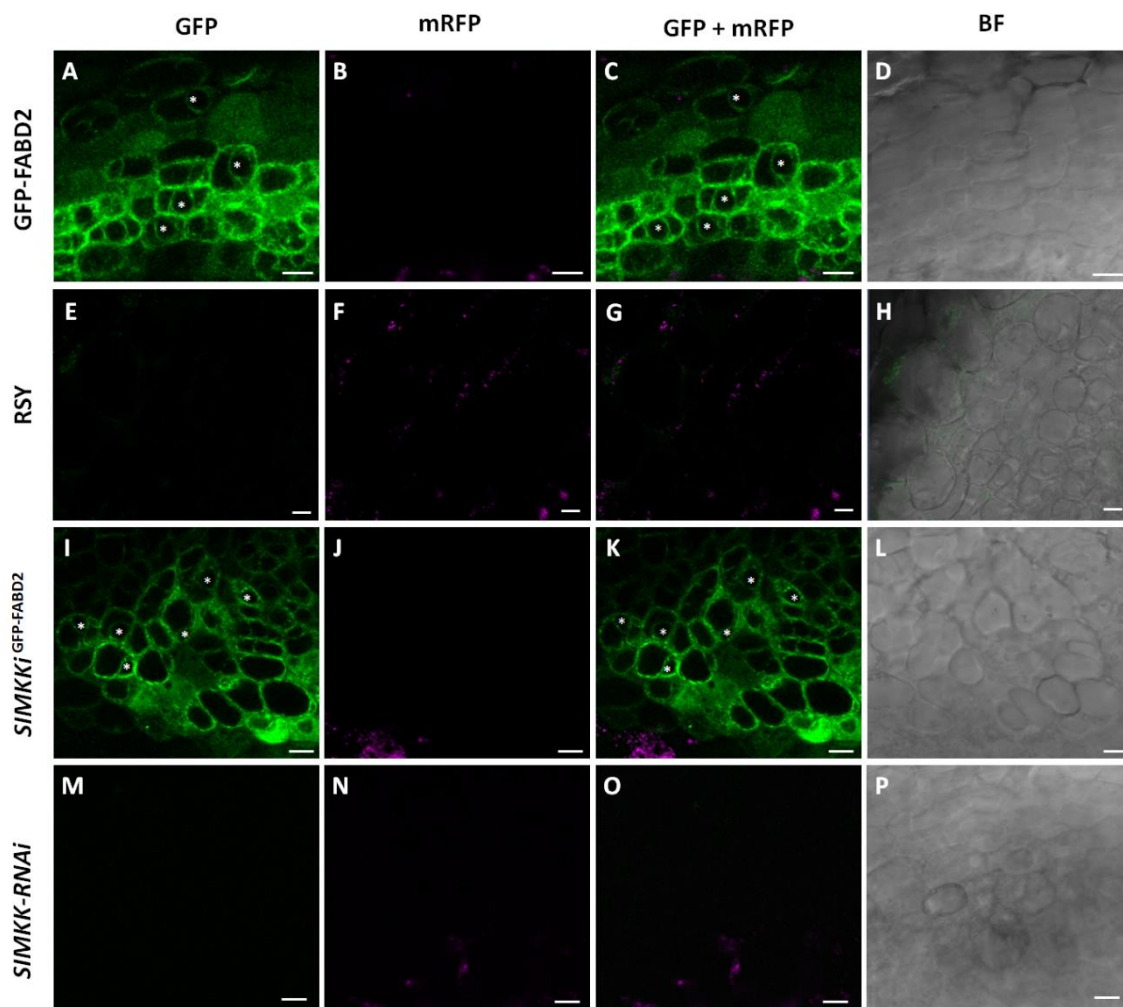
4.6 Mikroskopická analýza organizácie aktínového cytoskeletu v koreňových hlúčkach rastlín *M. sativa*

Na mikroskopickú dokumentáciu funkčných koreňových hlúčok u rastlín *M. sativa* po aplikácii *S. meliloti* s produkciou fluorescenčného proteínu mRFP boli použité transgénne línie GFP-FABD2, *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, *SIMKK-RNAi* a kontrolná línia RSY. Transgénne línie rastlín *M. sativa* s produkciou fluorescenčného markeru GFP-FABD2 boli použité na charakterizáciu štruktúry a organizácie aktínového cytoskeletu v bunkách funkčných koreňových hlúčok. Príprava preparátov z prierezov koreňových hlúčok a ich sledovanie prebiehala v rozmedzí 23. až 27. dňa po aplikácii *S. meliloti*. Snímanie pripravených preparátov prebiehalo pomocou konfokálneho mikroskopu s využitím laseru 488 nm na detekciu signálu GFP (excitácia pri 488 nm, emisné spektrum 493-551 nm) a laseru 561 nm na detekciu baktérií *S. meliloti* produkujúcich fluorescenčný proteín mRFP (excitácia pri 561 nm, emisné maximum 582-754 nm), a pomocou objektívov so zväčšením 10x a 40x. Červený signál mRFP baktérií *S. meliloti* bol počas vyhotovenia snímok konvertovaný na fialovú farbu, kvôli lepšej viditeľnosti. Snímky sú zobrazené spojením Z rovín pomocou funkcie ortogonálnej projekcie a zobrazením X-Z a Y-Z pohľadov. Získané údaje boli semi-kvantitatívne vyhodnotené pomocou funkcie profilových meraní v jednej optickej rovine k štúdiu lineárnej distribúcie intenzity fluorescence GFP-FABD2.

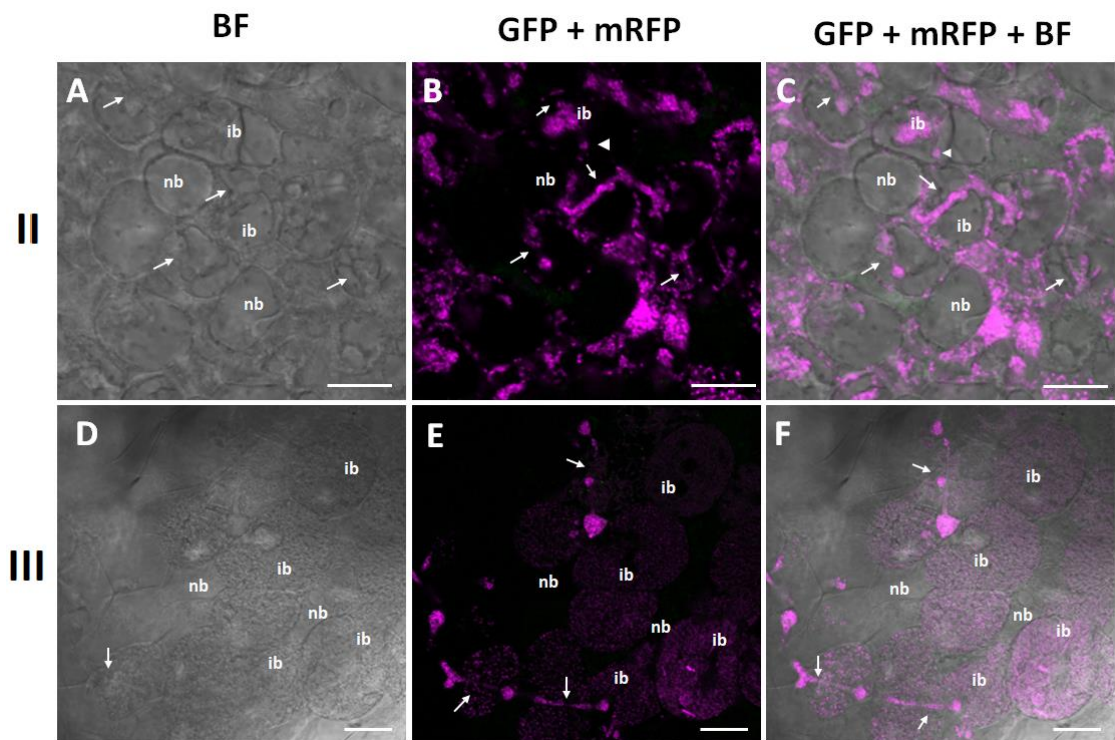
Proces tvorby koreňových hlúčok bol pozorovaný u všetkých kontrolných a transgénnych línií rastlín *M. sativa*. Na prierezoch koreňových hlúčok bolo možné určiť jednotlivé histologické zóny, aj v strednej časti (Obr. 26). Najvyšší fluorescenčný signál mRFP bol viditeľný v infikovaných bunkách infekčnej zóny koreňovej hlúčky a v mieste medzi prechodom z infekčnej zóny do zóny fixácie dusíka. V zóne fixácie dusíka a v senescentnej zóne bol fluorescenčný signál mRFP v infikovaných bunkách podstatne znížený. Transgénne línie produkujúce fluorescenčný proteín GFP-FABD2 mali najväčšiu mieru GFP signálu v apikálnom meristeme a v bunkách kôry koreňovej hlúčky. Bunky apikálneho meristému v transgénnych líniách GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} vykazovali sieť aktínových vlákien v okolí jadier, ktorá bola spojená s cytoplazmatickými vláknami a kortikálnou časťou buniek (Obr. 27). Medzi líniami neboli pozorované rozdiely. Delením buniek apikálneho meristému vznikajú nové bunky, ktoré sú postupne infikované prerastajúcimi infekčnými vláknami pomocou infekčných kvapiek s rhizóbiami. Infikovanie buniek rhizóbiami bolo pozorované v infekčnej zóne

u všetkých línií (Obr. 28, 29, 30, 31). Infikované bunky sú rozlíšiteľné od neinfikovaných buniek prítomnosťou bakteroidov, ktoré vyplňali infikované bunky. V zóne fixácie dusíka boli infikované bunky zväčšené a úplne vyplnené bakteroidmi (Obr. 28, 29, 32, 33). Fluorescenčný signál mRFP bol pozorovaný v infekčných vláknach. Intenzita fluorescenčného signálu mRFP bola znížená v infikovaných bunkách fixujúcich dusík oproti bunkám infekčnej zóny a infekčným vláknam. Neinfikované bunky u transgénej línie GFP-FABD2 vykazovali v infekčnej zóne a v zóne fixácie dusíka neporušenú aktínovú sieť (Obr. 30). U transgénej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} nebola v neinfikovaných bunkách, ktoré sa nachádzali v infekčnej zóne a v zóne fixácie dusíka, pozorovaná aktínová organizácia. Fluorescenčný signál GFP bol u dvojitej transgénej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} oproti GFP-FABD2 línií znížený. V senescentnej zóne, v ktorej infikované bunky fixujúce dusík sú neaktívne, sa v infikovaných bunkách okrem infekčných vlákien takmer nenachádzal žiadny fluorescenčný signál mRFP. Fluorescenčný signál GFP v neinfikovaných bunkách taktiež nebol v tejto zóne pozorovaný (Obr. 34)

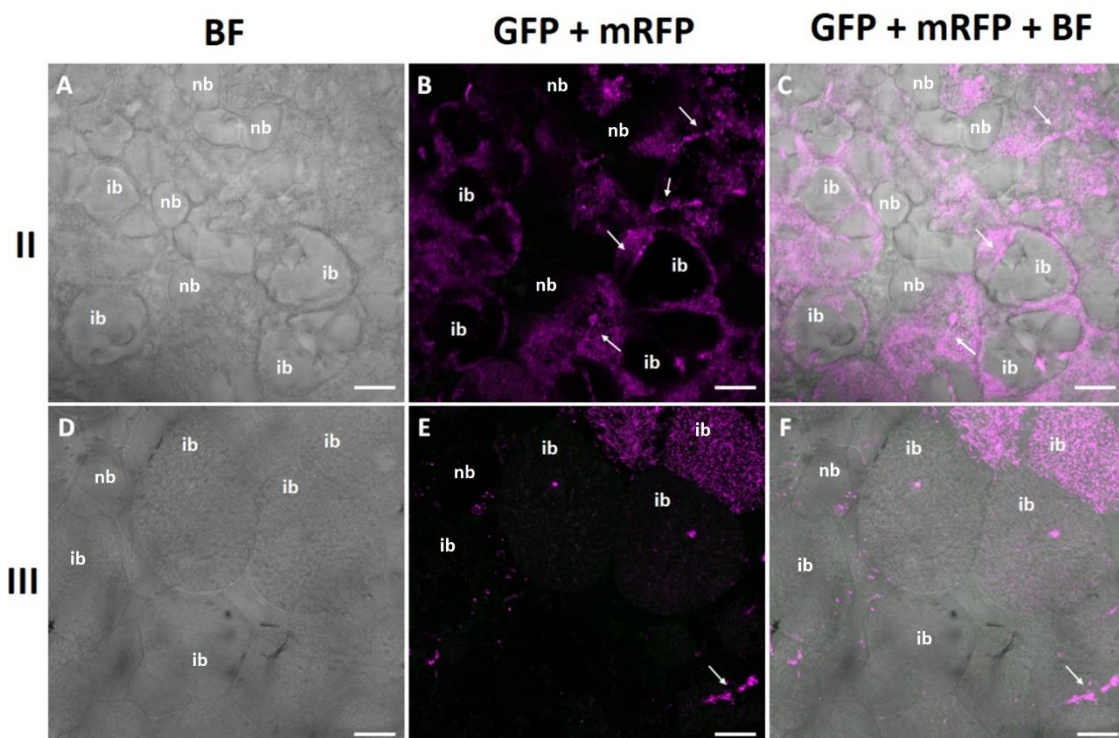
V blízkosti apikálneho meristému bolo u transgénej línie GFP-FABD2 pozorované prerastanie infekčných vlákien do vnútra buniek. V tomto skorom štádiu infekcie mali bunky podobnú aktínovú štruktúru ako neinfikované bunky. V oblasti infekčných vlákien prerastajúcich do buniek sa nachádzala hustá sieť hrubých aktínových zväzkov, ktorá ich obklopovala (Obr. 35 A, B, C; Video 4, 5, 6, Prílohy). Pomocou merania profilu intenzity fluorescencie GFP-FABD2 bolo možné vidieť zvýšené intenzity v oblasti prerastajúcich infekčných vlákien (Obr. 35 B, I, M). Pohľady z X-Z a Y-Y rovín zobrazovali okolo prerastajúcich infekčných vlákien organizáciu aktínového cytoskeletu (Obr. 35 F, G, J, K, O, P). Po infekcii bol v infikovaných bunkách fluorescenčný signál GFP oproti neinfikovaným bunkám potlačený. Napriek tomu boli u transgénej línie GFP-FABD2 v blízkosti infekčnej zóny pozorované v infikovaných bunkách fixujúcich dusík fragmenty F-aktínu a tenké aktínové vlákna v kortikálnej časti infikovaných buniek (Obr. 36). U dvojitej transgénej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} nebola v infikovaných bunkách pozorovaná žiadna aktínová organizácia.



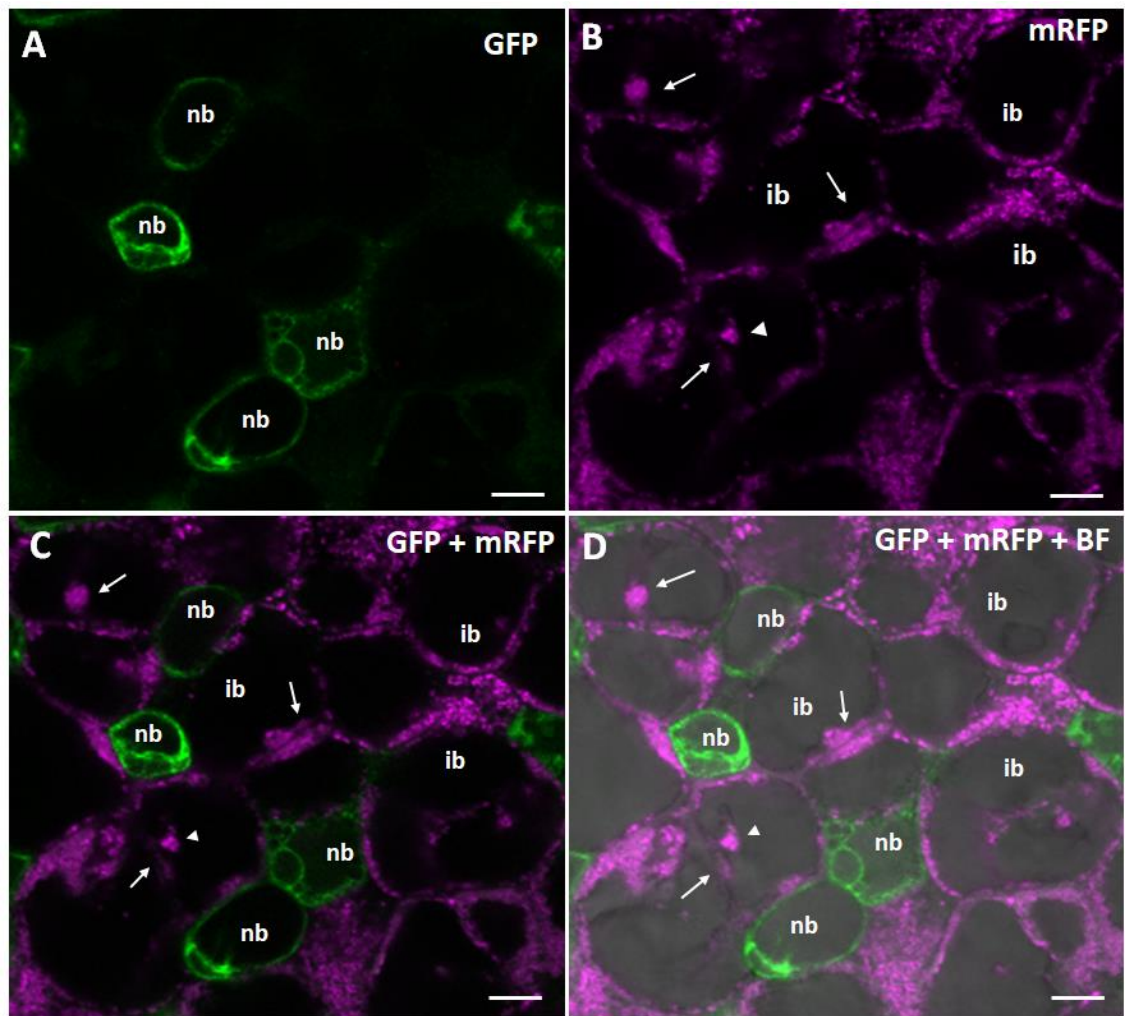
Obrázok 27. Apikálny meristém koreňových hlúčok u rastlín *M. sativa* (A-D) transgéennej línie GFP-FABD2, (E-H) transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (I-L) kontrolnej línie RSY a (M-P) transgéennej línie *SIMKK-RNAi*. Snímky sú zobrazené (A, E, I, M) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B, F, J, N) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (C, G, K, O) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, a (D, H, L, P) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Hviezdičky (A, C, I, K) označujú jadrá. Mierky = 10 μ m.



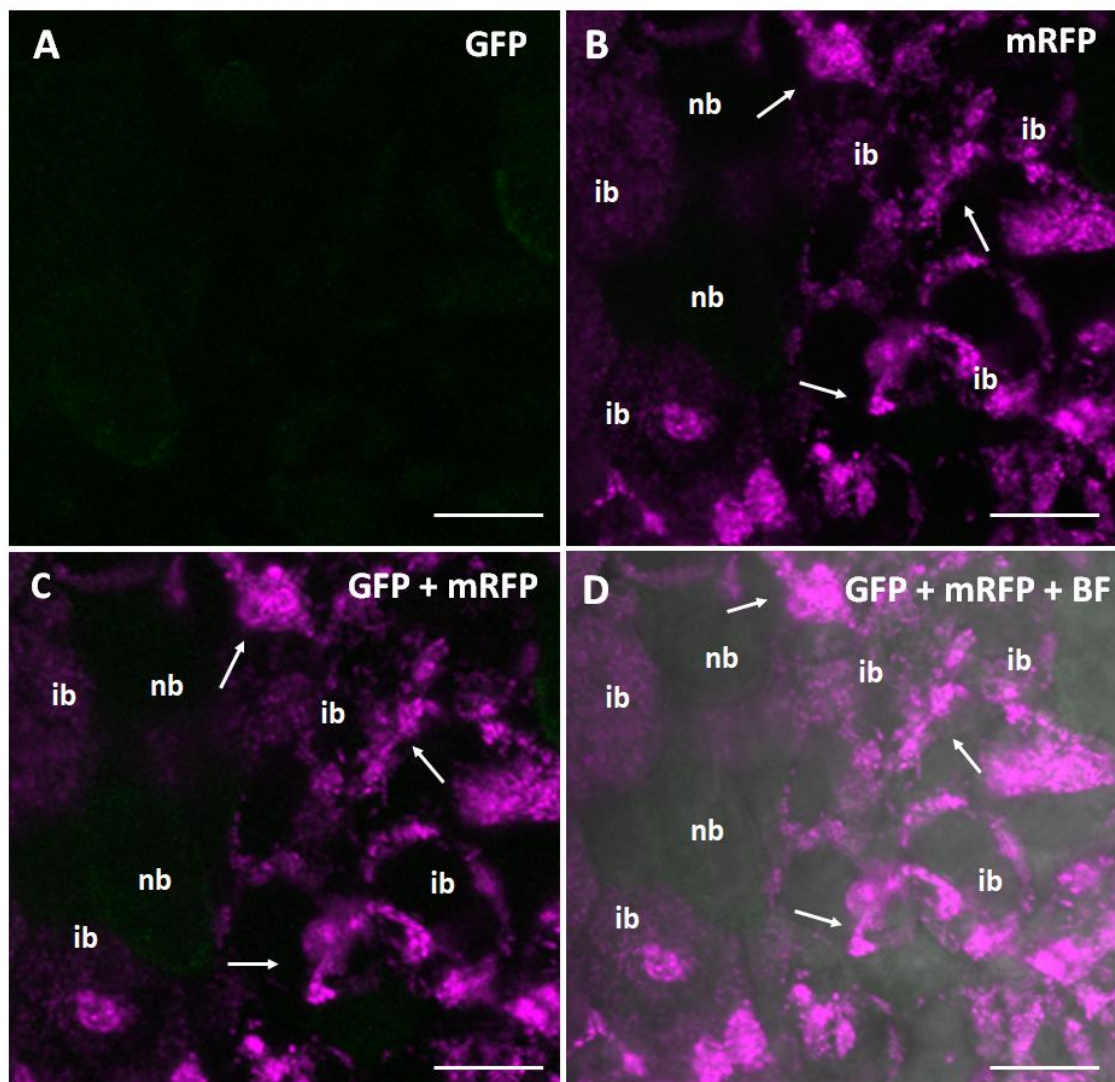
Obrázok 28. Infekčná zóna (II) a zóna fixácie dusíka (III) v koreňových hl'úzkach u rastlín *M. sativa* kontrolnej línie RSY. Snímky sú zobrazené (A, D) v prechádzajúcom svetle (BF); (B, E) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, a (C, F) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Šípky označujú infekčné vlákna a hroty infekčné kvapôčky. (ib) infikovaná bunka; (nb) neinfikovaná bunka. Mierka = 10 μ m.



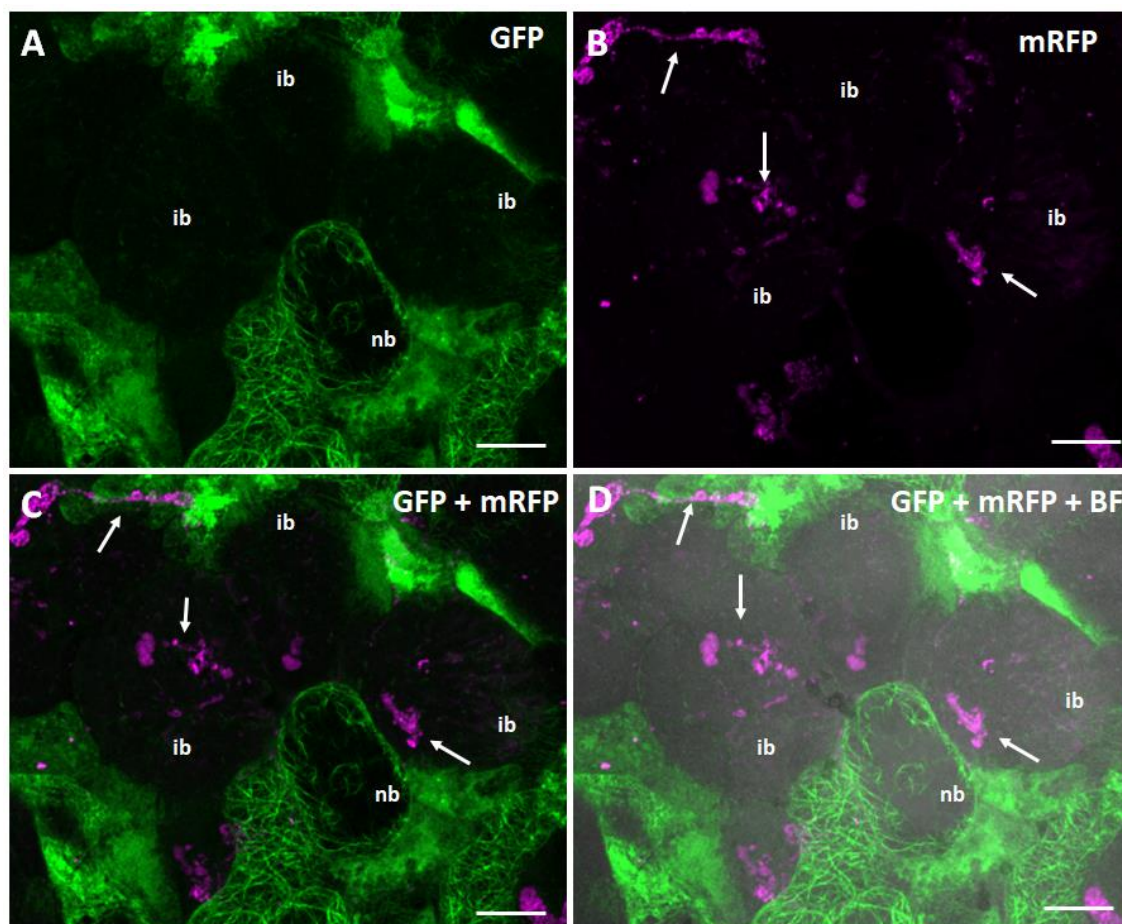
Obrázok 29. Infekčná zóna (II) a zóna fixácie dusíka (III) v koreňových hlúčkach u rastlín *M. sativa* transgénnej líniei *SIMKK-RNAi*. Snímky sú zobrazené (A, D) v prechádzajúcom svetle (BF); (B, E) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, (C, F) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Šípky označujú infekčné vlákna. (ib) infikovaná bunka; (nb) neinfikovaná bunka. Mierka 20 = μm .



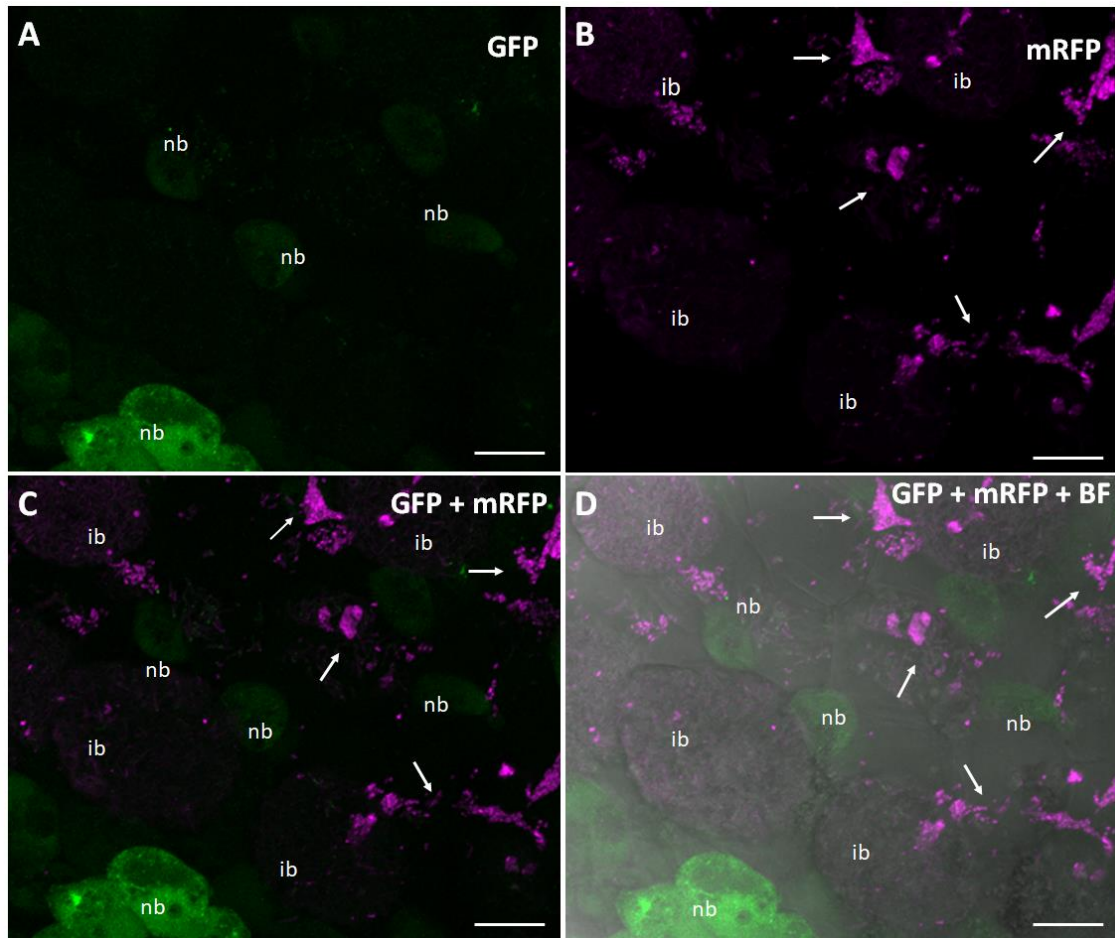
Obrázok 30 Infekčná zóna (II) v koreňovej hlúzke u rastliny *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2. Snímky sú zobrazené (A) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, (C) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, a (D) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Šípky označujú infekčné vlákna a hroty infekčné kvapôčky. (ib) infikovaná bunka; (nb) neinfikovaná bunka. Mierka = 10 μ m.



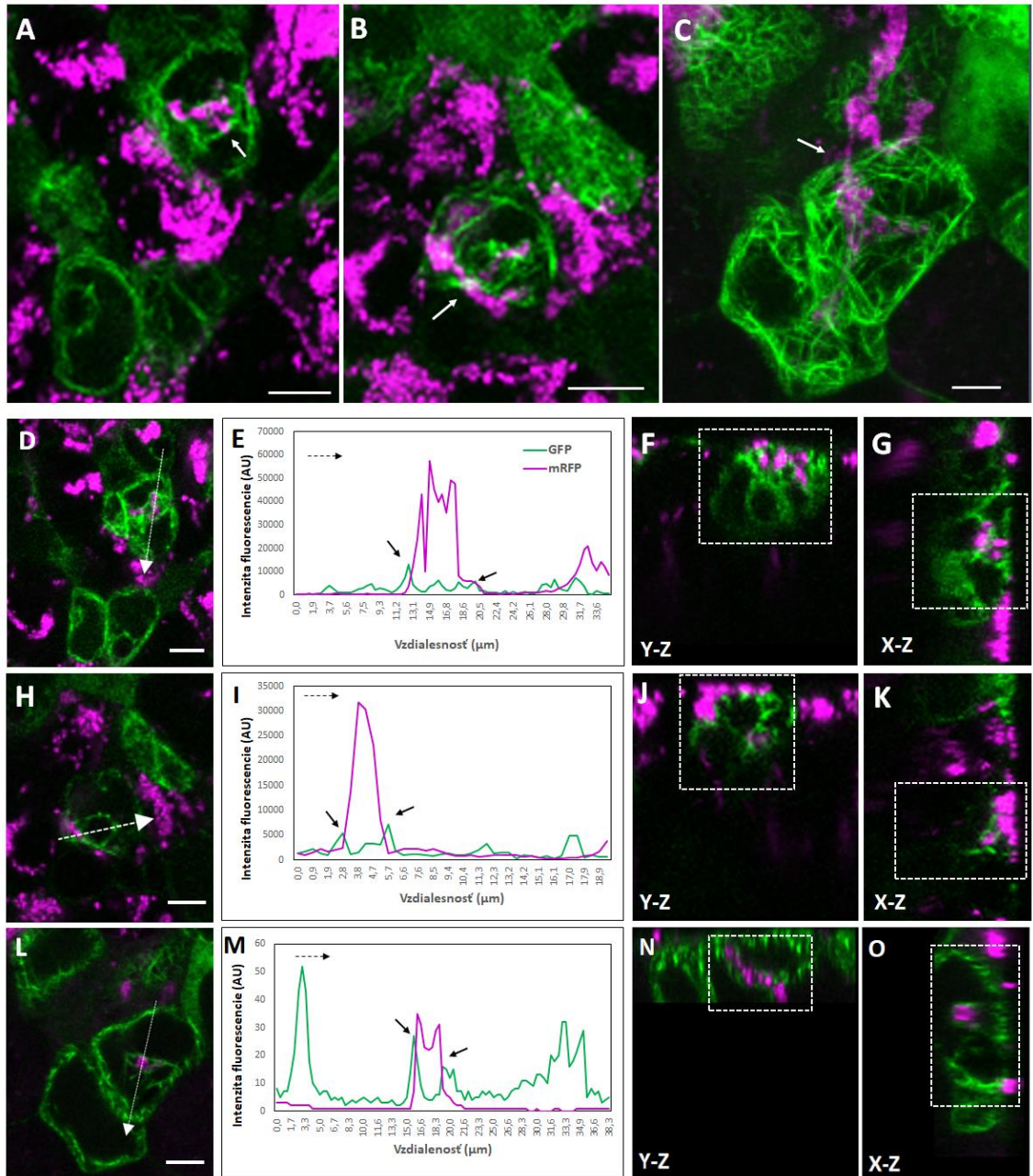
Obrázok 31. Infekčná zóna (II) v koreňovej hl'úzke u rastliny *M. sativa* transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Snímky sú zobrazené (A) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP (C) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, a (D) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Šípky označujú infekčné vlákna. (ib) infikovaná bunka; (nb) neinfikovaná bunka. Mierky = 20 μ m.



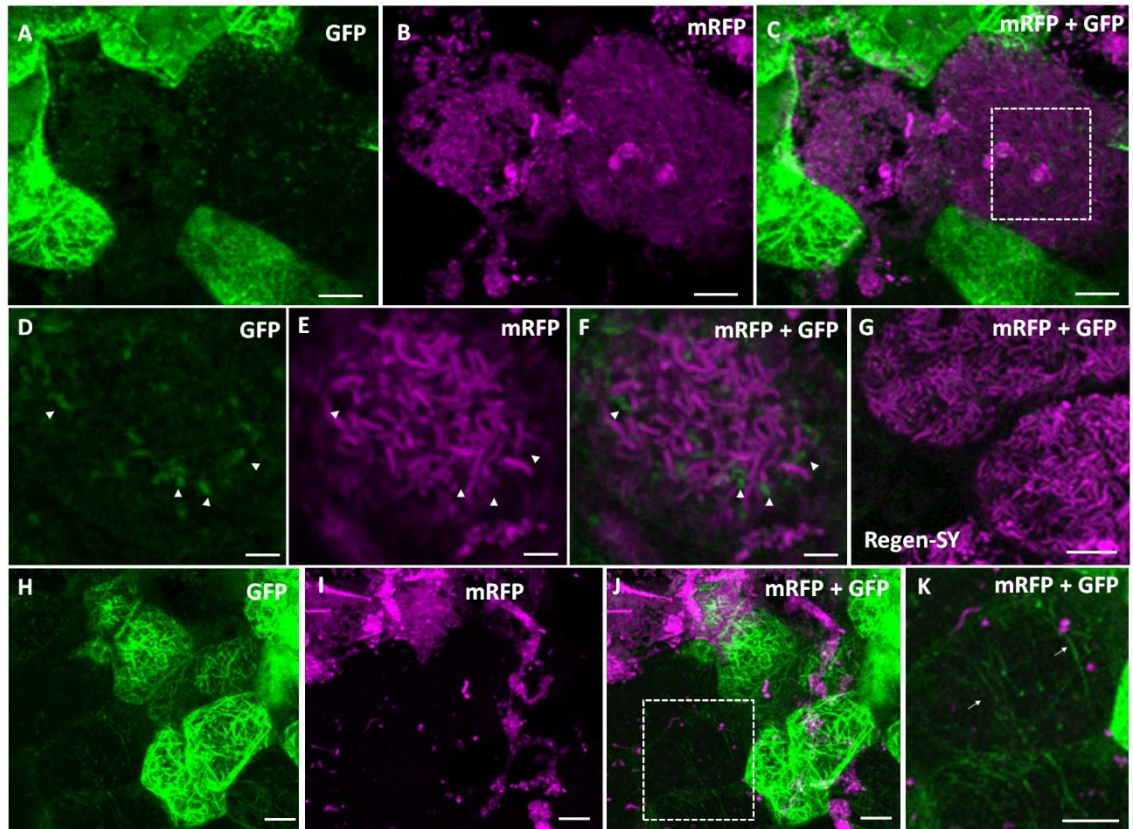
Obrázok 32. Zóna fixácie dusíka (III) v koreňovej hľúzke u rastliny *M. sativa* transgénnej línie GFP-FABD2. Snímky sú zobrazené (A) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP (C) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, a (D) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Šípky označujú infekčné vlákna. (ib) infikovaná bunka; (nb) neinfikovaná bunka. Mierky = 20 μm .



Obrázok 33. Zóna fixácie dusíka (III) v koreňovej hl'úzke u rastliny *M. sativa* transgénnej línie *SIMKK-RNAi^{GFP-FABD2}*. Snímky sú zobrazené (A) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP (C) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP, a (D) ako prekryv fluorescenčných kanálov pre mRFP, GFP a prechádzajúceho svetla (BF). Šípky označujú infekčné vlákna. (ib) infikovaná bunka; (nb) neinfikovaná bunka. Mierky = 20 μm.



Obrázok 35. Aktínový cytoskelet v skorom štádiu infekcie buniek. Snímky sú zobrazené ako prekryv fluorescenčných kanálov pre GFP a mRFP. (E, I, M) Distribúcia intenzity fluorescencie v smere prerušovanej šípky v (D, H, L). (F, J, N) Y-Z pohľad. (G, K, O) X-Z pohľad. Biele šípky (A-C) označujú infekčné vlákno. Čierne šípky (E, I, M) označujú zvýšenú intenzitu GFP-FABD2 signálu. Mierky = 5 μm .

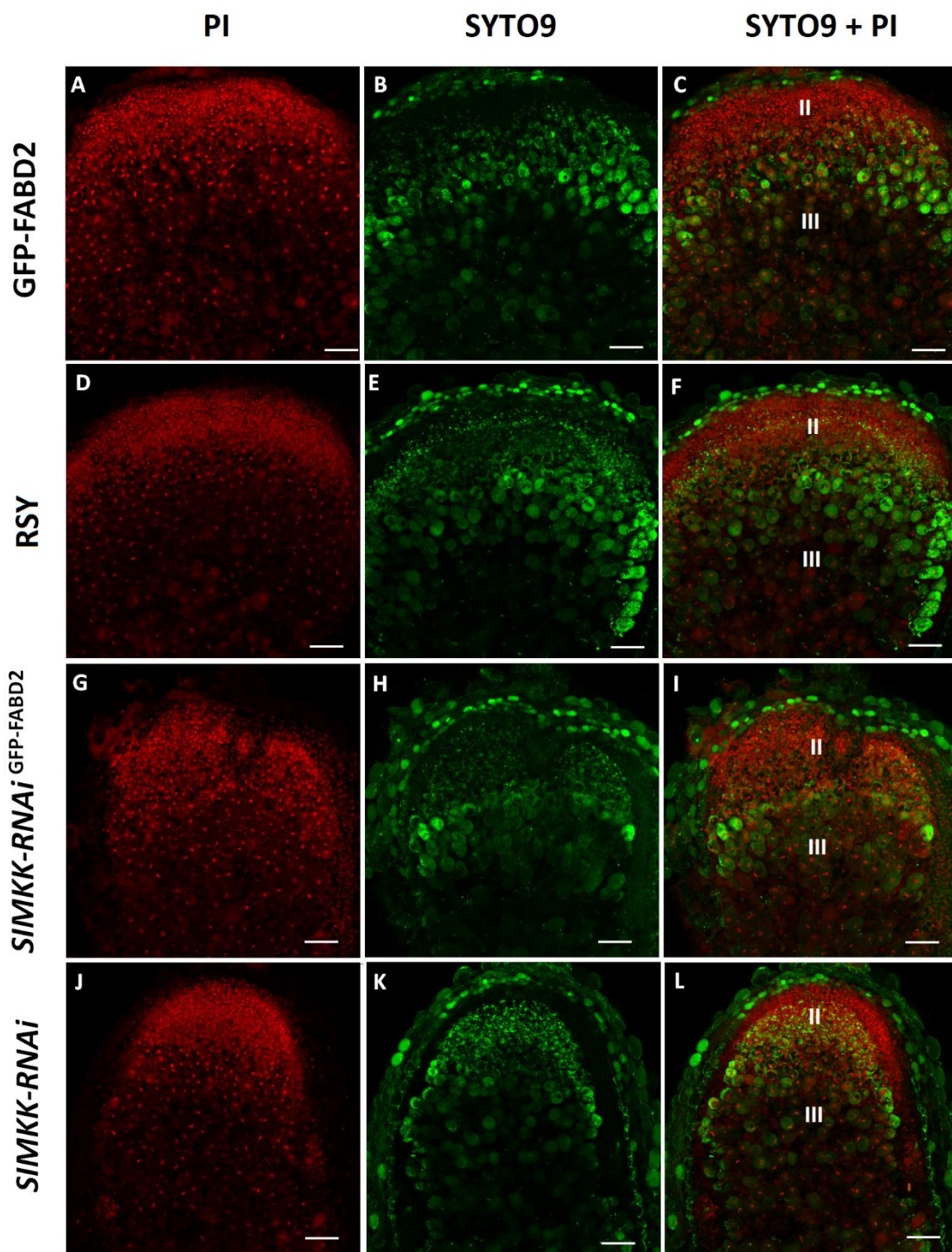


Obrázok 36. Detaily infikovaných buniek s bakteroidmi v blízkosti infekčnej zóny v koreňových hľúzkach rastlín *M. sativa* transgéennej línie GFP-FABD2. Snímky sú zobrazené (A, D, H) vo fluorescenčnom kanáli pre GFP, (B, E, I) vo fluorescenčnom kanáli pre mRFP, a (C, F, G, J, K) ako prekryv fluorescenčných kanálov mRFP a GFP. (D, E, F) Detail z jednej roviny z (C). (K) Detail z (J). (G) Infikovaná bunka kontrolnej línie RSY. Hroty (D-F) označujú aktínové fragmenty a šípky (K) aktínové vlákna. (A-C, G, H-K) Mierky = 10 μm ; (D-F) Mierky = 5 μm .

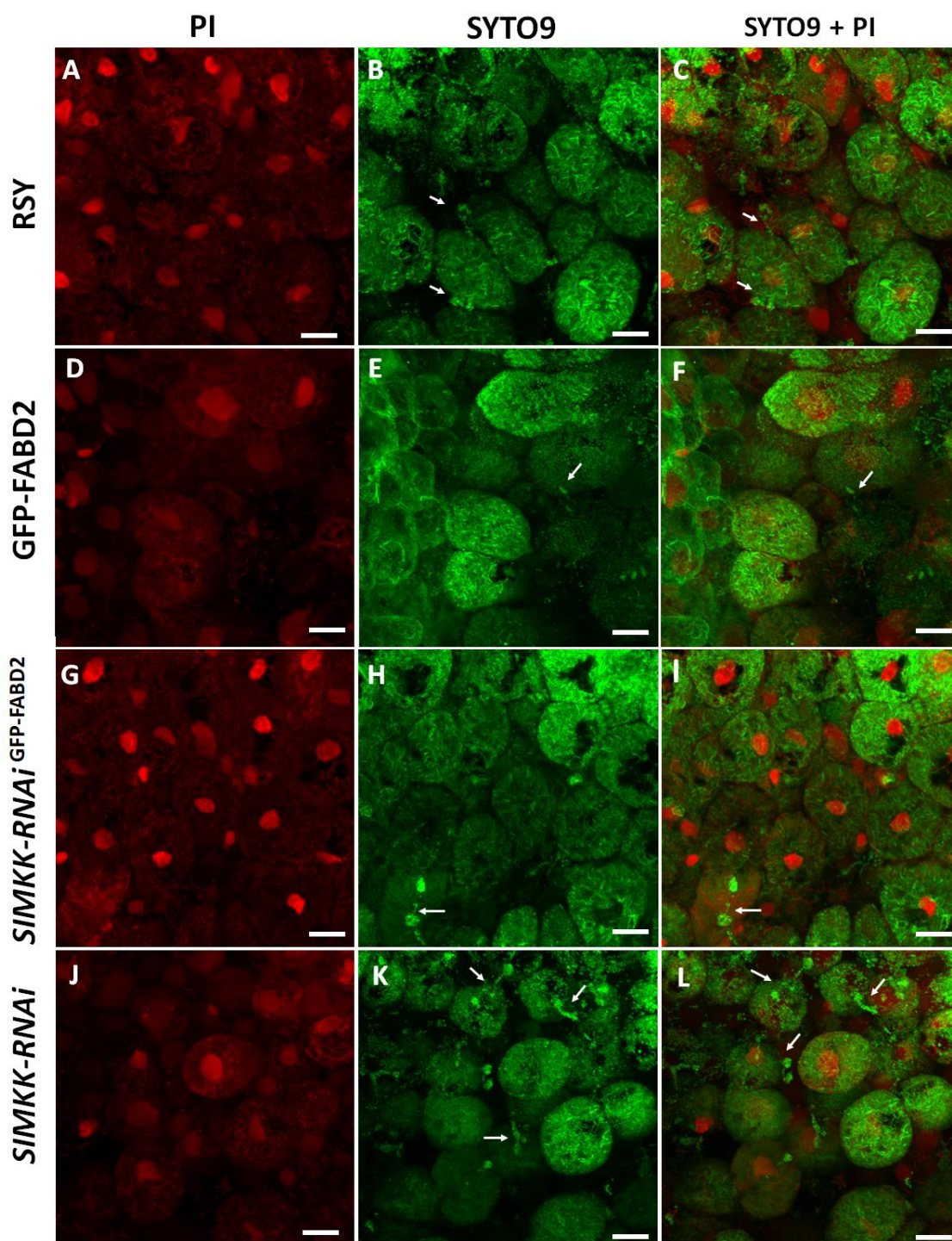
4.6.1 Mikroskopické pozorovanie histochemicky značených koreňových hľúzok

Na mikroskopické pozorovanie vitality bakteroidov vo vnútri infikovaných buniek funkčných koreňových hľúzok u rastlín *M. sativa* kontrolnej línie RSY a transgénnych línií GFP-FABD2, *SIMKK-RNAi*, *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} 25 dní po aplikácii *S. meliloti* produkujúceho fluorescenčný proteín mRFP, bolo použité histochemické značenie pomocou zmesi fluorescenčných farbív SYTO9 a propídium jodid (PI). SYTO9 prestupuje cez plazmatickú membránu živých prokaryotických a eukaryotických buniek, pričom vyžaruje zelenú emisiu. PI preniká cez poškodené plazmatické membrány mŕtvych buniek, značí DNA v jadrách a vyžaruje červenú fluorescenciu. U živých buniek funkčnou cytoplazmatickou membránou nepreniká, značí teda len povrch buniek (bunkovú stenu u rastlinných buniek). Pozdĺžne prierezy koreňových hľúzok boli značení zmesou SYTO9 a PI, a snímané pomocou konfokálneho mikroskopu s využitím laseru 488 nm na detekciu signálu SYTO9 (excitácia pri 488 nm, emisné maximum pri 503 nm) a na detekciu signálu PI (excitácia pri 535 nm, emisné maximum pri 617) a pomocou objektívov so zväčšením 10x a 40x.

Z prehľadných snímok z koreňových hľúzok u kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa* sa najsilnejšia intenzita fluorescencie SYTO9 nachádzala v infekčnej zóne a v zóne fixácie dusíka (Obr. 37). Fluorescenčný signál SYTO9 sa smerom ku senescentnej zóne znižoval. Najsilnejšia intenzita signálu PI sa nachádzala v infekčnej zóne u všetkých línií, to však môže byť do značnej miery spôsobené aj čiastočným zachytením emisného signálu fluorescenčného proteínu mRFP zo *S. meliloti*. V zóne fixácie dusíka SYTO9 zafarbilo infikované bunky u všetkých línií, pričom boli pozorované živé bakteroidy svietiace na zeleno (Obr. 38). SYTO9 taktiež zafarbila infekčné vlákna. PI zafarbilo jadrá infikovaných buniek a mŕtve bakteroidy. Rozdiely vo vitalite bakteroidov vo vnútri infikovaných buniek koreňových hľúzok z rôznych porovnávaných línií neboli pozorované.



Obrázok 37. Funkčné koreňové hľúžky značené zmesou SYTO9/PI u rastlín *M. sativa* (A-C) transgéennej línie GFP-FABD2, (D-F) kontrolnej línie RSY, (G-I) transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a (J-L) transgéennej línie *SIMKK-RNAi*. Snímky sú zobrazené (A, D, G, J) vo fluorescenčnom kanáli pre PI; (B, E, H, K) vo fluorescenčnom kanáli pre SYTO9, a (C, F, I, L) ako prekryv fluorescenčných kanálov PI a SYTO9. (II) infekčná zóna, (III) zóna fixácie dusíka. Mierky = 100 μ m.



Obrázok 38. Infikované bunky v zóne fixácie dusíka koreňových hl'úzok rastlín *M. sativa* (A-C) kontrolnej línie RSY, (D-F) transgéennej línie GFP-FABD2, (G-I) transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a (J-L) transgéennej línie *SIMKK-RNAi*. Snímky sú zobrazené (A, D, G, J) vo fluorescencnom kanáli pre SYTO9; (B, E, H, K) vo fluorescencnom kanáli pre PI, a (C, F, I, L) ako prekryv fluorescencných kanálov PI a SYTO9. Šípkami sú označené infekčné vlákna. Mierka = 20 μ m.

5 DISKUSIA

Symbiotická fixácia dusíka je dôležitým procesom pre udržateľné poľnohospodárstvo, ktorá spočíva vo vzájomnom partnerstve medzi strukovinami a prospešnými baktériami fixujúce atmosférický dusík. Aktivácia signalizačnej dráhy je nevyhnutná pre počiatočné aj neskoršie interakcie medzi strukovinami a rizóbiami. Vo všeobecnosti jedným z hlavných mechanizmov prenosu signálu, ktorý riadi reakciu buniek na vonkajšie podnety, je fosforylácia proteínov. Konkrétne niekoľko fyziologických a vývojových procesov v rastlinách je regulovaných signálnymi kaskádami závislými od MAPK. Taktiež mnohé proteínkinázy sa podieľajú aj na symbiotických interakciách a vývoji koreňových hlúčok (Grimsrud *et al.*, 2010; Komis *et al.*, 2018b; Roy *et al.*, 2020). Zatiaľ čo u modelových druhov strukovín, ako je *M. truncatula* a *L. japonicus*, boli extenzívne skúmané procesy symbiotickej fixácie dusíka, o regulácii symbiotických interakcií a tvorbe koreňových hlúčok u *M. sativa* je známych relatívne málo informácií (Roy *et al.*, 2020).

Jednou z identifikovaných MAPK u *M. sativa* je SIMK a jej špecifický aktivátor SIMKK, u ktorých bolo preukázané, že sú aktivované pôsobením elicitorov a soľného stresu (Cardinale *et al.*, 2000; Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002). LjSIP2, ktorá zdieľa 88% podobnosť aminokyselín so SIMKK, interaguje s receptorovou kinázou SymRK a jej cieľom fosforylácie je LjMPK6. U *L. japonicus* je tento signalizačný modul potrebný na organogénu a tvorbu koreňových hlúčok (Chen *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2019). Transgénná línia *SIMKK-RNAi* s potlačenou expresiou *SIMKK* a *SIMK* sa vyznačuje tvorbou kratších koreňových vláskov a nižším počtom infekčných vlákien a koreňových hlúčok (Hrbáčková *et al.*, 2021; Hlaváčková *et al.*, 2023b). Z výsledkov fenotypovej analýzy v predkladanej práci bolo zistené, že obidve transgénne línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a *SIMKK-RNAi* majú znížený počet infekčných vlákien. Avšak štatisticky preukazný rozdiel bol iba u línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} oproti transgéennej línii GFP-FABD2 v 6. dni po aplikácii *S. meliloti*. Celkový počet koreňových hlúčok bol u transgéennej línie *SIMKK-RNAi* znížený, zatiaľ čo prekvapivo u transgéennej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} bol celkový počet koreňových hlúčok spolu s transgéennou líniou GFP-FABD2 väčší oproti kultivaru RSY. Oproti tomu počet funkčných koreňových hlúčok bol najnižší u transgéenných línii *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a *SIMKK-RNAi*. Možným vysvetlením väčšieho celkového počtu koreňových hlúčok u *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} je ovplyvnenie fenotypu produkciou fluorescenčného proteínu GFP-FABD2. Dá sa

teda predpokladať, že znížená expresia *SIMKK* a *SIMK* má negatívny efekt na tvorbu infekčných vlákien a koreňových hlúčok. Na štatisticky preukazné overenie efektivity tvorby infekčných vlákien a koreňových hlúčok je nutné pridať do kvantitatívnej analýzy väčšie množstvo biologických replík.

SIMK je prevažne lokalizovaná v jadrách epidermálnych buniek koreňa, pričom pri vývoji koreňových vláskov dochádza k jej aktivácii a presune do špičiek rastúcich koreňových vláskov. Tento presun súvisí s usporiadaním vlákien aktínových mikrofilamentov, typickým pre vrcholový rast koreňových vláskov. *SIMK* prispieva k rastu a vývoju koreňových vláskov možnou fosforyláciou a kontrolou niektorých proteínov viažucich aktín, čo ovplyvňuje dynamiku a štruktúru aktínového cytoskeletu (Baluška *et al.*, 2000; Šamaj *et al.*, 2002). Mikroskopickým snímaním koreňov transgénnych línií GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} z „mokrej kontroly“ boli pozorované malé zmeny v usporiadaní a dynamike aktínového cytoskeletu v koreňových vláskoch. Z výsledkov vyplýva, že znížená produkcia proteínu *SIMK*, by mohla mať vplyv na dynamiku aktínových vlákien.

Aktínový cytoskelet zohráva dôležitú rolu v symbiotických interakciách, pri ktorých počas skorých štádií rhizobiálnej infekcie dochádza k jeho zmene organizácie a k rýchlej prestavbe. Táto reorganizácia je riadená pomocou mnohých aktín-viažucich proteínov (Hlaváčková *et al.*, 2023a). Pomocou konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom boli v koreňových vláskoch po inokulácii so *S. meliloti*, pozorované typické štádia rhizobiálnej infekcie. U GFP-FABD2 línie bola v mieste zachytenia rhizóbií, ich internalizácie a tvorby nového infekčného vlákna sledovaná zvýšená intenzita signálu GFP-FABD2. U obidvoch transgénnych línií bola kvantitatívne vyhodnotená distribúcia intenzity fluorescencie na overenie GFP-FABD2 signálu v oblasti infekčných váčkov a infekčných vlákien. V oblasti tvoriacich sa infekčných váčkov sa nachádzal najmä difúzny signál, pričom infekčné vlákna obklopovali aktínové vlákna. Z výsledkov vychádza, že aktínový cytoskelet je nevyhnutným komponentom rhizobiálnej infekcie. Taktiež má rolu vo vezikulárnom transporte, ktorý je potrebný na tvorbu infekčného vlákna a k usmerňovaniu jeho rastu. Medzi transgénnymi líniami s produkciou fluorescenčného proteínu GFP-FABD2 nebol pozorovaný rozdiel v dynamike aktínového cytoskeletu. Je potrebné taktiež zobrať do úvahy, že preparáty na sledovanie rhizobiálnej infekcie v koreňových vláskoch boli pripravené z odrezaných častí koreňov a boli pozorované v horizontálnej polohe v úzkom priestore medzi podložným a krycím sklíčkom. Kvôli tomu by bolo potrebné zopakovať mikroskopické analýzy pomocou

neinvazívnych mikroskopických metód ako je napr. „light-sheet“ fluorescenčná mikroskopia, ktorou je možné dlhodobé snímanie intaktných rastlín pri takmer prirodzených podmienkach.

Na pochopenie úlohy aktínového cytoskeletu vo vývoji koreňových hlúčok *M. sativa* je potrebné odhalenie presnej organizácie aktínu spojenej s kľúčovými udalosťami, ako je predlžovanie a vetvenie infekčných vlákien, tvorba infekčných kvapôčok a uvoľňovanie rhizóbií vo vnútri infikovaných buniek. U *M. truncatula* bola štruktúra aktínového cytoskeletu s vekom infikovaných buniek sprevádzaná fragmentáciou F-aktínu na malé fragmenty a aktínové bodky (Zhang *et al.*, 2019). Naše mikroskopické pozorovanie rezov koreňových hlúčok transgénnych rastlín *M. sativa* línie GFP-FABD2 preukázalo rolu aktínového cytoskeletu v skorých štádiách infikovaných buniek, kedy boli pozorované tesne usporiadané aktínové vlákna v oblasti predlžujúcich sa infekčných vlákien. Oproti neinfikovaným bunkám, v ktorých sa nachádzala neporušená aktínová sieť, bola intenzita GFP-FABD2 signálu v infikovaných bunkách potlačená. Napriek tomu boli pozorované fragmenty F-aktínu v infikovaných bunkách s bakteroidmi a v niektorých infikovaných bunkách v kortikálnej oblasti tenké aktínové vlákna. U transgénej línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} bola intenzita signálu GFP-FABD2 natoľko potlačená, že nebola pozorovaná aktínová organizácia ani v neinfikovaných bunkách. Pravdepodobným dôvodom prečo intenzita fluorescencie GFP-FABD2 bola v infikovaných bunkách natoľko potlačená je použitie *CaMV35S* promotora. U *M. truncatula* sa ukázalo, že intenzita fluorescenčných proteínov bola v infikovaných bunkách pod kontrolou *CaMV35S* promotora utlmená, prípadne tiež pravdepodobne v dôsledku fluorescenčného zhášania neznámou bunkovou zložkou. Ako alternatíva *CaMV35* promotora by mohol byť použitý konštitutívny *EF1 α* promotor alebo *pUBQ10* promotor (Auriac a Timmers, 2007).

Mikroskopickou analýzou histochemického značenia pozdĺžnych rezov v koreňových hlúčkoch u všetkých línií rastlín *M. sativa* boli pozorované živé infikované bunky s bakteroidmi v zóne fixácie dusíka. Medzi líniami neboli viditeľné rozdiely vo vitalite bakteroidov, čo môže naznačovať, že transgéne línie s potlačenou expresiou *SIMKK* a *SIMK* nemusia mať efekt na zníženie životnosť bakteroidov v infikovaných bunkách. V praktickej časti mala byť taktiež zaradená imunoblotová analýza na určenie prítomnosti a úrovne produkcie fúzneho proteínu GFP-FABD2 a proteínu SIMK a aktivite fosforylovaných MAPK vo funkčných koreňových hlúčkoch u kontrolných a transgénnych rastlín *M. sativa*. Avšak kvôli nízkemu počtu vytvorených funkčných

koreňových hľúzok u línii *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a *SIMKK-RNAi* nebolo možné túto analýzu zrealizovať.

6 ZÁVER

V predkladanej diplomovej práci bola vypracovaná teoretická časť zameraná na súčasný stav literatúry na signálne, morfológické a vývojové aspekty skorých symbiotických procesov a tvorby koreňových hľúzok medzi baktériami rodu *Rhizobium* a strukovinami so zameraním na rastlinný druh *M. sativa*. Nakoľko v praktickej časti tejto práce boli použité transgénne línie s produkciou fluorescenčného proteínu GFP-FABD2, bol v ďalšej kapitole teoretickej časti popísaný aktínový cytoskelet rastlinných buniek vrátane proteínov viažucich sa na aktín, vizualizácie aktínového cytoskeletu v rastlinných bunkách a štrukturálnych zmien aktínového cytoskeletu počas symbiotických interakcií. V ďalšej časti teoretického úvodu bol popísaný pokrok v moderných mikroskopických metódach a transformačných technikách u *M. sativa*.

V praktickej časti tejto práci boli pripravené kontrolné a transgénne rastliny *M. sativa* prostredníctvom somatickej embryogenézy na kokultiváciu s baktériami *S. meliloti*. Pre determinovanie fenotypu počas kokultivácie rastlín *M. sativa* s baktériami *S. meliloti* bola kvantitatívne a štatisticky vyhodnotená efektivita tvorby infekčných vlákien a tvorby koreňových hľúzok. Z výsledkov bolo zistené, že transgénne línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a *SIMKK-RNAi* majú znížený počet infekčných vlákien a funkčných koreňových hľúzok, ale celkový počet koreňových hľúzok bol znížený iba u línie *SIMKK-RNAi*.

Na dokumentáciu usporiadania a dynamiky aktínového cytoskeletu počas rhizobiálnej infekcie koreňových vláskov boli preparáty snímané pomocou konfokálneho mikroskopu s rotujúcim diskom. Mikroskopickou analýzou transgénnych línií s produkciou GFP-FABD2 bola zdokumentovaná organizácia a dynamika aktínového cytoskeletu v skorých štádiách rhizobiálnej infekcie. U oboch línií bola pozorovaná akumulácia GFP-FABD2 signálu v oblasti infekčných váčkov a infekčných vlákien, pri ktorých sa taktiež nachádzali aktínové filamenty, ale rozdiely v štruktúre a dynamike aktínového cytoskeletu neboli pozorované.

Mikroskopickou dokumentáciou organizácie aktínového cytoskeletu pomocou konfokálneho mikroskopu boli v infikovaných bunkách koreňových hľúzok transgéennej línie GFP-FABD2 počas skorých štádií pozorované aktínové vlákna usporiadané okolo predlžujúcich sa infekčných vlákien. V zóne fixácie dusíka boli v infikovaných bunkách s bakteroidmi pozorované fragmenty F-aktínu a tenké aktínové vlákna.

Histochemickým značením koreňových hľúzok bola overená vitalita bakteroidov v infikovaných bunkách, pričom nebol pozorovaný žiadny rozdiel medzi líniami.

7 ZOZNAM LITERATÚRY

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Allen, N. S. and Bennett, M. N. (1996) "Electro-Optical Imaging of F-Actin and Endoplasmic Reticulum in Living and Fixed Plant Cells," *Scanning Microscopy*, 10(14).
- Allen, N. S., Bennet, M. N., Cox, D. N., Shipley, A., Ehrhardt, D. W., Long, S. R. (1994). Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca⁺⁺ and H⁺ currents and on cytoskeletal behavior, In Downie, J.A., Osbourn, A.E., Daniels, M. J. (Eds.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Springer, 107-113.
- Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E. D., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., Long, S. R., Dénarié, J., & Gough, C. (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal*, 34(4), 495-506. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01743.x>
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D. G., & de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor-Dependent MtENOD11 Activation in Root Hairs via a Novel cis-Regulatory Motif. *The Plant Cell*, 19(9), 2866-2885. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052944>
- Ané, J. -M., Kiss, G. B., Riely, B. K., Penmetsa, R. V., Oldroyd, G. E. D., Ajax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J. -M., Kalo, P., et al. (2004). *Medicago truncatula* DMII1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science*, 303(5662), 1364-1367. <https://doi.org/10.1126/science.1092986>
- Annicchiarico, P., Barrett, B., Brummer, E. C., Julier, B., & Marshall, A. H. (2015). Achievements and Challenges in Improving Temperate Perennial Forage Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 327-380. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898462>
- Antolín-Llovera, M., Ried, M. K., & Parniske, M. (2014). Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE Ectodomain Promotes Complex Formation with Nod Factor Receptor 5. *Current Biology*, 24(4), 422-427. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.053>
- Armstrong, J. M. (1954). CYTOLOGICAL STUDIES IN ALFALFA POLYPLOIDS. *Canadian Journal of Botany*, 32(4), 531-542. <https://doi.org/10.1139/b54-050>
- Arrighi, J. -F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E. -P., Ghérardi, M., Huguet, T., et al. (2006). The *Medicago truncatula* Lysine Motif-Receptor-Like Kinase Gene Family Includes NFP and New Nodule-Expressed Genes. *Plant Physiology*, 142(1), 265-279. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084657>
- Auriac M.-C. & Timmers C. J. A. (2007). Nodulation Studies in the Model Legume *Medicago truncatula*: Advantages of Using the Constitutive *EF1α* Promoter and Limitations in Detecting Fluorescent Reporter Proteins in Nodule Tissues. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 1040-1047. <https://doi.org/10.1094 / MPMI -20-9-1040>.
- Babaoglu, Mehmet & Davey, Michael & Power, J. (2000). Genetic engineering of grain legumes: key transformation events. *AgBiotechNet*, 2.
- Baluška, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Šamaj, J., Chua, N. -H., Barlow, P. W., & Volkmann, D. (2000). Root Hair Formation: F-Actin-Dependent Tip Growth Is Initiated by Local Assembly of Profilin-Supported F-Actin Meshworks Accumulated within Expansin-Enriched Bulges. *Developmental Biology*, 227(2), 618-632. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9908>
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vyplelová, P., Ovečka, M., Luptovčiak, I., Illés, P., Kuchařová, A., Šamaj, J. (2015). Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-TagTM in various plants. *Frontiers in Plant Science* 6, 336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00336>
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H. F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793), 1642-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>

- Bora, K. S., & Sharma, A. (2010). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), 211-220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
- Braun, M., Hauslage, J., Czogalla, A., & Limbach, C. (2004). Tip-localized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta*, 219(3), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1235-4>
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P. K., & Quinto, C. (1998). Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals. *Plant Physiology*, 116(3), 871-877. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.871>
- Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H.. 2002. Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell*, 14, 703-711.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., & Hirt, H. (2000). Differential Activation of Four Specific MAPK Pathways by Distinct Elicitors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36734-36740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>
- Cerri R.M., Frances L., Laloum T., Auriac M., Niebel A., Oldroyd G.E.D., Barker D.G., Fournier J., de Carvalho-Niebel F. (2012). *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiology*, 160(4), 2155-2172. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203190>
- Cerri, M. R., Frances, L., Kelner, A., Fournier, J., Middleton, P. H., Auriac, M. -C., Mysore, K. S., Wen, J., Erard, M., Barker, D. G., *et al.* (2016). The Symbiosis-Related ERN Transcription Factors Act in Concert to Coordinate Rhizobial Host Root Infection. *Plant Physiology*, 171(2), 1037-1054. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00230>
- Davidson, A. L., & Newcomb, W. (2001). Changes in actin microfilament arrays in developing pea root nodule cells. *Canadian Journal of Botany*, 79(7), 767-776. <https://doi.org/10.1139/b01-046>
- de Ruijter, N. C. A., Bisseling, T., & Emons, A. M. C. (1999). Rhizobium Nod Factors Induce an Increase in Sub-apical Fine Bundles of Actin Filaments in *Vicia sativa* Root Hairs within Minutes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(9), 829-832. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.9.829>
- DeLong, M. M., Swanberg, D. R., Oelke, E. A., Hanson, C., Onischak, M., Schmid, M. R., and Wiant, B. C. (1995). Sustainable biomass energy production and rural economic development using alfalfa as a feedstock. *Second Biomass Conference of the Americas: Energy, Environment, Agriculture, and Industry*, 1582-1591.
- Dénarié, J., Debelle, F., & Promé, J. -C. (1996). RHIZOBIUM LIPO-CHITOLIGOSACCHARIDE NODULATION FACTORS: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 503-535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>
- Diao, M., Ren, S., Wang, Q., Qian, L., Shen, J., Liu, Y., & Huang, S. (2018). Arabidopsis formin 2 regulates cell-to-cell trafficking by capping and stabilizing actin filaments at plasmodesmata. *ELife*, 7, 36316. <https://doi.org/10.7554/eLife.36316>
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169-186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiological Reviews*, 83(2), 433-473. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>
- Drøbak, B. K., Franklin-Tong, V. E., & Staiger, C. J. (2004). The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytologist*, 163(1), 13-30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01076.x>
- Dyachok, J., Paez-Garcia, A., Yoo, CM., Palanichelvam, K., Blancaflor, E.B. (2016). Fluorescence Imaging of the Cytoskeleton in Plant Roots. In Gavin, R. (Eds.), *Cytoskeleton Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 1365. Humana Press, 139-153.

- Dyba, M., & Hell, S. W. (2003). Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission. *Applied Optics*, 42(25), 5123-9. <https://doi.org/10.1364/AO.42.005123>
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., & Kiss, G. B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417(6892), 962-966. <https://doi.org/10.1038/nature00842>
- Fahraeus, G. (1957). The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Microbiology*, 16(2), 374-381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. -H., Lin, Y. -H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61-76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Fonouni-Farde, C., Tan, S., Baudin, M., Brault, M., Wen, J., Mysore, K. S., Niebel, A., Frugier, F., & Diet, A. (2016). DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nature Communications*, 7(1), 12636. <https://doi.org/10.1038/ncomms12636>
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Genre, A., & Bonfante, P. (2002). Epidermal cells of a symbiosis-defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organisation in the presence of a mycorrhizal fungus. *Protoplasma*, 219(1-2), 43-50. <https://doi.org/10.1007/s007090200004>
- Girkin, J. M., & Carvalho, M. T. (2018). The light-sheet microscopy revolution. *Journal of Optics*, 20(5), 053002. <https://doi.org/10.1088/2040-8986/aab58a>
- Grimsrud, P. A., den Os, D., Wenger, C. D., Swaney, D. L., Schwartz, D., Sussman, M. R., Aneć, J. -M., & Coon, J. J. (2010). Large-Scale Phosphoprotein Analysis in *Medicago truncatula* Roots Provides Insight into *in vivo* Kinase Activity in Legumes. *Plant Physiology*, 152(1), 19-28. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149625>
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Dräxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T. L., & Parniske, M. (2010). NENA , a *Lotus japonicus* Homolog of Sec13 , Is Required for Rhizodermal Infection by Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Rhizobia but Dispensable for Cortical Endosymbiotic Development. *The Plant Cell*, 22(7), 2509-2526. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069807>
- Guan, D., Stacey, N., Liu, C., Wen, J., Mysore, K. S., Torres-Jerez, I., Vernié, T., Tadege, M., Zhou, C., & Wang, Z. -yu. (2013). Rhizobial Infection Is Associated with the Development of Peripheral Vasculature in Nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 162(1), 107-115. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215111>
- Gustafsson, M. G. L. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2), 82-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>
- Hadri, A.-E. , Spaink, H.P. , Bisseling, T. , Brewin, N.J. (1998). Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In H.P. Spaink , A. Kondorosi , and P.J.J. Hooykaas (Eds.), *The Rhizobiaceae*. Springer, 347–360.
- Haney, C. H., & Long, S. R. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 478-483. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910081107>
- Hlaváčková, K., Šamaj, J., & Ovečka, M. (2023a). Cytoskeleton as a roadmap navigating rhizobia to establish symbiotic root nodulation in legumes. *Biotechnology Advances*, 69, 108263. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108263>
- Hlaváčková, K., Šamajová, O., Hrbáčková, M., Šamaj, J., Ovečka, M., & Foo, E. (2023b). Advanced microscopy resolves dynamic localization patterns of stress-induced mitogen-

- activated protein kinase (SIMK) during alfalfa root hair interactions with *Ensifer meliloti*. *Journal of Experimental Botany*, 74(12), 3729-3748. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad111>
- Holweg, C. L. (2007). Living markers for actin block myosin-dependent motility of plant organelles and auxin. *Cell Motility*, 64(2), 69-81. <https://doi.org/10.1002/cm.20164>
- Hrbáčková, M., Luptovčiak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., Novák, D., Bednarz, H., Niehaus, K., Ovečka, M. *et al.* (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal*, 19(4), 767-784. <https://doi.org/10.1111/pbi.13503>
- Hwang, J. U., Suh, S., Yi, H., Kim, J., & Lee, Y. (1997). Actin Filaments Modulate Both Stomatal Opening and Inward K-Channel Activities in Guard Cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiology*, 115(2), 335-342. <https://doi.org/10.1104/pp.115.2.335>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263(5148), 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Charpentier, M., & Oldroyd, G. E. D. (2013). Nuclear Calcium Signaling in Plants. *Plant Physiology*, 163(2), 496-503. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220863>
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., & Parniske, M. (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX Are Ion Channels Essential for Perinuclear Calcium Spiking in Legume Root Endosymbiosis. *The Plant Cell*, 20(12), 3467-3479. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063255>
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T. V., Radhakrishnan, G. V., Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A. -A., Sanders, D., Morris, R. J., & Oldroyd, G. E. D. (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*, 352(6289), 1102-1105. <https://doi.org/10.1126/science.aae0109>
- Chen, T., Zhu, H., Ke, D., Cai, K., Wang, C., Gou, H., Hong, Z., & Zhang, Z. (2012). A MAP Kinase Kinase Interacts with SymRK and Regulates Nodule Organogenesis in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell*, 24(2), 823-838. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095984>
- Cheng, H. -P., & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5183-5191. <https://doi.org/10.1128/JB.180.19.5183-5191.1998>
- Chilton, M. -D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263-271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)
- Indrasumunar, A., Searle, I., Lin, M. -H., Kereszt, A., Men, A., Carroll, B. J., & Gresshoff, P. M. (2011). Nodulation factor receptor kinase 1 α controls nodule organ number in soybean (*Glycine max* L. Merr). *The Plant Journal*, 65(1), 39-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04398.x>
- Ivanov, S., Fedorova, E. E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., & Bisseling, T. (2012). Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8316-8321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200407109>
- Jones, K. M. (2012). Increased Production of the Exopolysaccharide Succinoglycan Enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 Symbiosis with the Host Plant *Medicago truncatula*. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4322-4331. <https://doi.org/10.1128/JB.00751-12>
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S. R., Rogers, J., *et al.* (2005). Nodulation Signaling in Legumes Requires NSP2, a Member of the GRAS Family of Transcriptional Regulators. *Science*, 308(5729), 1786-1789. <https://doi.org/10.1126/science.1110951>
- Kanamori, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E. M. H., Miwa, H., Downie, J. A., James, E. K., Felle, H. H., Haaning, L. L., *et al.* (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(2), 359-364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508883103>

- Kar, S., Loganathan, M., Dey, K., Shinde, P., Chang, H. -Y., Nagai, M., & Santra, T. S. (2018). Single-cell electroporation: current trends, applications and future prospects. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 28(12), 123002. <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aae5ae>
- Karlen, D. L., Lemunyon, J. L., Singer, J.W. (2007): Forages for conservation and improved soil quality. In Barnes R. F., Nelson C. J., Moore K. J., Collins M. (Eds.), *Forages. Vol. 2, The Science of Grassland Agriculture*, (6th edition). Blackwell Publishing Professional, 149-166.
- Kazmierczak T., Yang L., Boncompagni E., Meilhoc E., Frugier F., Frendo P., Bruand C., Gruber V., Brouquisse R. (2020). Legume nodule senescence: a coordinated death mechanism between bacteria and plant cells. In Frendo P., Masson-Boivin C., Frugier F. (Eds.), *Advances in Botanical Research, Regulation of Nitrogen-Fixing Symbioses in Legumes*, 94. Academic press, Elsevier,
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & S. Ramu, V. (2018). Methods of Plant Transformation- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 2656-2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>
- Ketelaar, T., Anthony, R. G., & Hussey, P. J. (2004). Green Fluorescent Protein-mTalin Causes Defects in Actin Organization and Cell Expansion in Arabidopsis and Inhibits Actin Depolymerizing Factor's Actin Depolymerizing Activity in Vitro. *Plant Physiology*, 136(4), 3990-3998. <https://doi.org/10.1104/pp.104.050799>
- Ketelaar, T., Emons, A.M. (2009). The Actin Cytoskeleton in Root Hairs: A Cell Elongation Device. In Emons, A.M.C., Ketelaar, T. (Eds.), *Root Hairs. Plant Cell Monographs*, 12. Springer, 211-232.
- Kevei, Z., Loughon, G., Mergaert, P., Horváth, G. V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G. B., *et al.* (2008). 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase1 Interacts with NOR1 and Is Crucial for Nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 19(12), 3974-3989. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053975>
- Khurana, P., Henty, J. L., Huang, S., Staiger, A. M., Blanchoin, L., & Staiger, C. J. (2010). Arabidopsis VILLIN1 and VILLIN3 Have Overlapping and Distinct Activities in Actin Bundle Formation and Turnover. *The Plant Cell*, 22(8), 2727-2748. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076240>
- Kim, S., Zeng, W., Bernard, S., Liao, J., Venkateshwaran, M., Ane, J. -M., & Jiang, Y. (2019). Ca₂-regulated Ca_v channels with an RCK gating ring control plant symbiotic associations. *Nature Communications*, 10(1), 3703. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11698-5>
- Komis, G., Novák, D., Ovečka, M., Šamajová, O., & Šamaj, J. (2018a). Advances in Imaging Plant Cell Dynamics. *Plant Physiology*, 176(1), 80-93. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00962>
- Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2018b). Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 237-265. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040314>
- Korobchevskaya, K., Lagerholm, B., Colin-York, H., & Fritzsche, M. (2017). Exploring the Potential of Airyscan Microscopy for Live Cell Imaging. *Photonics*, 4(4), 41. <https://doi.org/10.3390/photonics4030041>
- Kost, B., Spielhofer, P., & Chua, N. -H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *The Plant Journal*, 16(3), 393-401. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00304.x>
- Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., & Kawaguchi, M. (2010). How Many Peas in a Pod? Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. *Plant and Cell Physiology*, 51(9), 1381-1397. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq107>
- Kristó, I., Bajusz, I., Bajusz, C., Borkúti, P., & Vilmos, P. (2016). Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. *Histochemistry and Cell Biology*, 145(4), 373-388. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1400-9>
- Lacroix, B., Citovsky, V. (2020). Biolistic Approach for Transient Gene Expression Studies in Plants. In Rustgi, S., Luo, H. (Eds.), *Biolistic DNA Delivery in Plants. Methods in Molecular Biology*, 2124. Humana, 125-139.

- Lamb, J. F. S., Jung, H. J. G., Sheaffer, C. C., and Samac, D. A. (2007): Alfalfa leaf protein and stem cell wall polysaccharide yields under hay and biomass management systems. *Crop Science Journal* 47, 1407–1415. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.10.0665>
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M. -F., Mun, J. -H., Larrainzar, E., Cook, D. R., Gamas, P., *et al.* (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 481-494. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert392>
- Lazarides, E., & Weber, K. (1974). Actin Antibody: The Specific Visualization of Actin Filaments in Non-Muscle Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(6), 2268-2272. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.6.2268>
- Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Hervé, C., Tóth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., *et al.* (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2343-2348. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913320107>
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., & Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344(6268), 781-784. <https://doi.org/10.1038/344781a0>
- Liang, P., Stratil, T. F., Popp, C., Marín, M., Folgmann, J., Mysore, K. S., Wen, J., & Ott, T. (2018). Symbiotic root infections in *Medicago truncatula* require remorin-mediated receptor stabilization in membrane nanodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 5289-5294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721868115>
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2003). LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science*, 302(5645), 630-633. <https://doi.org/10.1126/science.1090074>
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29), 10375-10380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504284102>
- Liu, C. -W., & Murray, J. (2016). The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/plants5030033>
- Liu, C. -W., Breakspear, A., Stacey, N., Findlay, K., Nakashima, J., Ramakrishnan, K., Liu, M., Xie, F., Endre, G., & de Carvalho-Niebel, F. (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nature Communications*, 10(1), 2848. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10029-y>
- Lopez-Gomez, M., Sandal, N., Stougaard, J., & Boller, T. (2012). Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 393-401. <https://doi.org/10.1093/jxb/err291>
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., *et al.* (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958), 637-640. <https://doi.org/10.1038/nature02045>
- Maizel, A., von Wangenheim, D., Federici, F., Haseloff, J., & Stelzer, E. H. K. (2011). High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *The Plant Journal*, 68(2), 377-385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04692.x>
- Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., & Mergaert, P. (2008). Cell Biology Of Nodule Infection And Development. *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, 7(6), 153-189. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7_6
- Melak, M., Plessner, M., & Grosse, R. (2017). Actin visualization at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(3), 525–530. <https://doi.org/10.1242/jcs.189068>
- Michaud R., Lehman W. F., Rumbaugh M. D. (1988): World distribution and historical development. In Hanson A. A., Barnes D. K., Hill R. R., (Eds.), *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, 29. The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, 25-91.

- Miller, D. D., De Ruijter, N. C. A., Bisseling, T., & Emons, A. M. C. (1999). The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *The Plant Journal*, 17(2), 141-154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00358.x>
- Murray, J. D., Muni, R. S. R. D., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Allen, S., Andriankaja, M., Li, G., Laxmi, A., Cheng, X., Wen, J., *et al.* (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 65(2), 244-252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04415.x>
- Ng, J. L. P., & Mathesius, U. (2018). Acropetal Auxin Transport Inhibition Is Involved in Indeterminate But Not Determinate Nodule Formation. *Frontiers in Plant Science*, 9, 169. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00169>
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development. *Current Biology*, 15(6), 531-535. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042>
- Ovečka, M., Sojka, J., Tichá, M., Komis, G., Basheer, J., Marchetti, C., Šamajová, O., Kuběňová, L., & Šamaj, J. (2022). Imaging plant cells and organs with light-sheet and super-resolution microscopy. *Plant Physiology*, 188(2), 683-702. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab349>
- Ovečka, M., Vaškebová, L., Komis, G., Luptovčíak, I., Smertenko, A., & Šamaj, J. (2015). Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols*, 10(8), 1234-1247. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.081>
- Ovečka, M., von Wangenheim, D., Tomančák, P., Šamajová, O., Komis, G., & Šamaj, J. (2018). Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nature Plants*, 4(9), 639-650. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0238-2>
- Paradez, A., Wright, A., & Ehrhardt, D. W. (2006). Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 571-578. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.005>
- Pasternak, T., Tietz, O., Rapp, K., Begheldo, M., Nitschke, R., Ruperti, B., & Palme, K. (2015). Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods*, 11(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2>
- Peremyslov, V. V., Prokhnevsky, A. I., Avisar, D., & Dolja, V. V. (2008). Two Class XI Myosins Function in Organelle Trafficking and Root Hair Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1109-1116. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113654>
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>
- Radović, J., Sokolovic, D., & Markovic, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475. <https://doi.org/10.2298/BAH0906465R>
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., *et al.* (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585-592. <https://doi.org/10.1038/nature02039>
- Ramkumar, T.R., Lenka, S.K., Arya, S.S., Bansal, K.C. (2020). A Short History and Perspectives on Plant Genetic Transformation. In Rustgi, S., Luo, H. (Eds.), *Biolytic DNA Delivery in Plants. Methods in Molecular Biology*, 2124. Humana, 39-68.
- Reddy, G. V., Gordon, S. P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Unravelling developmental dynamics: transient intervention and live imaging in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 491-501. <https://doi.org/10.1038/nrm2188>
- Ridge R.W. (1992). A model of legume root hair growth and *Rhizobium* infection. *Symbiosis*, 14, 359-373.

- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308-345. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>
- Roth LE, Stacey G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology*, 49(1), 13-23.
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15-41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10), 793-796. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., *et al.* (2007). NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell*, 19(2), 610-624. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046938>
- Samac D. A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In Wang K., (Ed.), *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, 343. Springer, 301-311.
- Sappl, P. G., & Heisler, M. G. (2013). Live-imaging of plant development: latest approaches. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.10.006>
- Sheahan, M. B., Staiger, C. J., Rose, R. J., & McCurdy, D. W. (2004). A Green Fluorescent Protein Fusion to Actin-Binding Domain 2 of Arabidopsis Fimbrin Highlights New Features of a Dynamic Actin Cytoskeleton in Live Plant Cells. *Plant Physiology*, 136(4), 3968-3978. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049411>
- Shumilina, J., Soboleva, A., Abakumov, E., Shtark, O. Y., Zhukov, V. A., & Frolov, A. (2023). Signaling in Legume–Rhizobia Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17397. <https://doi.org/10.3390/ijms242417397>
- Schmidt, S. M., & Panstruga, R. (2007). Cytoskeleton functions in plant–microbe interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), 135-148. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.01.001>
- Singer, S. D., Hannoufa, A., & Acharya, S. (2018). Molecular improvement of alfalfa for enhanced productivity and adaptability in a changing environment. *Plant, Cell and Environment*, 41(9), 1955-1971. <https://doi.org/10.1111/pce.13090>
- Singh, S., & Parniske, M. (2012). Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 444-453. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.04.002>
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., & Parniske, M. (2014). CYCLOPS, A DNA-Binding Transcriptional Activator, Orchestrates Symbiotic Root Nodule Development. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.011>
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., & Bisseling, T. (2007). Medicago LYK3, an Entry Receptor in Rhizobial Nodulation Factor Signaling. *Plant Physiology*, 145(1), 183-191. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100495>
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS Protein Family Is Essential for Rhizobial Nod Factor-Induced Transcription. *Science*, 308(5729), 1789-1791. <https://doi.org/10.1126/science.1111025>
- Staiger, C. J. (2000). Signaling To The Actin Cytoskeleton In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), 257-288. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.257>
- Stebens, S., Pemble, H., Murrow, L., & Wittmann, T. (2012). Imaging Intracellular Protein Dynamics by Spinning Disk Confocal Microscopy. *Methods in Enzymology*, 504, 293-313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391857-4.00015-X>
- Steinwand, M. A., & Ronald, P. C. (2020). Crop biotechnology and the future of food. *Nature Food*, 1(5), 273-283. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0072-3>

- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., & Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 417(6892), 959-962. <https://doi.org/10.1038/nature00841>
- Su, C., Zhang, G., Rodriguez-Franco, M., Hinnenberg, R., Wietschorke, J., Liang, P., Yang, W., Uhler, L., Li, X., & Ott, T. (2023). Transcellular progression of infection threads in *Medicago truncatula* roots is associated with locally confined cell wall modifications. *Current Biology*, 33(3), 533-542.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.051>
- Su, H., Wang, T., Dong, H., & Ren, H. (2007). The Villin/Gelsolin/Fragmin Superfamily Proteins in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(8), 1183-1191. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00546.x>
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*, 12(7), 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.006>
- Sutton, M. A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., van Grinsven, H., & Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature*, 472(7342), 159-161. <https://doi.org/10.1038/472159a>
- Suzaki T., Yoro E., Kawaguchi M. (2015): Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology* 316, 111-158. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavačka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal*, 21(13), 3296-306. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf349>
- Šamaj, J., Baluška, F., & Menzel, D. (2004). New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends in Plant Science*, 9(5), 217-220. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.008>
- Tichá, M., Illéssová, P., Hrbáčková, M., Basheer, J., Novák, D., Hlaváčková, K., Šamajová, O., Niehaus, K., Ovečka, M., Šamaj, J. (2020): Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology* 40, 1265-1280. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1814689>
- Timmers, A. C. J., Auriac, M. -C., & Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 126(16), 3617-3628. <https://doi.org/10.1242/dev.126.16.3617>
- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 781-805. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>
- Urbiš P. (2020): Production of new lines of *Medicago sativa* with downregulation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) expression. [Diplomová práce]. Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika
- Valster, A. H., Pierson, E. S., Valenta, R., Hepler, P. K., & Emons, A. M. C. (2007). Probing the Plant Actin Cytoskeleton during Cytokinesis and Interphase by Profilin Microinjection. *The Plant Cell*, 9(10), 1815-1824. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1815>
- van Brussel A. A., Bakhuizen R., van Spronsen P. C., Spaink H. P., Tak T., Lugtenberg B. J., Kijne J. W. (1992): Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. *Science* 257, 70-72. <https://doi.org/10.1126/science.257.5066.70>
- Van de Velde, W., Guerra, J. C. P., Keyser, A. D., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., Mergaert, P., Kondorosi, E., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2006). Aging in Legume Symbiosis. A Molecular View on Nodule Senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 141(2), 711-720. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078691>
- van der Honing, H. S., Kieft, H., Emons, A. M. C., & Ketelaar, T. (2012). Arabidopsis VILLIN2 and VILLIN3 Are Required for the Generation of Thick Actin Filament Bundles and for Directional Organ Growth. *Plant Physiology*, 158(3), 1426-1438. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192385>
- van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124-142. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.124-142.1995>

- Vantard, M., Cowling, R., & Delichère, C. (2000). Cell cycle regulation of the microtubular cytoskeleton. *Plant Molecular Biology*, 43(5/6), 691-703. <https://doi.org/10.1023/A:1006346107807>
- Vernié, T., Camut, S., Camps, C., Rembliere, C., de Carvalho-Niebel, F., Mbengue, M., Timmers, T., Gascioli, V., Thompson, R., le Signor, C., *et al.* (2016). PUB1 Interacts with the Receptor Kinase DMI2 and Negatively Regulates Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses through Its Ubiquitination Activity in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 170(4), 2312-2324. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01694>
- Vernié, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M. L., de Carvalho-Niebel, F., & Oldroyd, G. E. D. (2015). The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the *Medicago truncatula* Root. *The Plant Cell*, 27(12), 3410-3424. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00461>
- Vitha, S., Baluška, F., Braun, M., Šamaj, J., Volkmann, D., & Barlow, P. W. (2000). Comparison of cryofixation and aldehyde fixation for plant actin immunocytochemistry: aldehydes do not destroy F-actin. *The Histochemical Journal*, 32(8), 457-466. <https://doi.org/10.1023/A:1004171431449>
- Voigt B., Timmers A. C., Šamaj J., Müller J., Baluška F., Menzel D. (2005): GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of Arabidopsis seedlings. *European Journal of Cell Biology* 84, 595-608.
- Wang, X. (2011). Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *Functional & Integrative Genomics*, 11(1), 13-22. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0197-9>
- Wang, Y. -S., Motes, C. M., Mohamalawari, D. R., & Blancaflor, E. B. (2004). Green fluorescent protein fusions to Arabidopsis fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cell Motility*, 59(2), 79-93. <https://doi.org/10.1002/cm.20024>
- Wang, Y. -S., Yoo, C. -M., & Blancaflor, E. B. (2008). Improved imaging of actin filaments in transgenic Arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist*, 177(2), 525-536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02261.x>
- Wasteneys, G. O., & Galway, M. E. (2003). Remodeling the Cytoskeleton for Growth and Form: An Overview with Some New Views. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 691-722. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134818>
- Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F. A., Faulstich, H., & Wieland, T. (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4498-4502. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4498>
- Xie, F., Murray, J. D., Kim, J., Heckmann, A. B., Edwards, A., Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 633-638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113992109>
- Yan, Y., Zhu, X., Yu, Y., Li, C., Zhang, Z., & Wang, F. (2022). Nanotechnology Strategies for Plant Genetic Engineering. *Advanced Materials*, 34(7), 2106945. <https://doi.org/10.1002/adma.202106945>
- Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2022). Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 244-267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
- Yildiz, M., Aycan, M., & Park, S. (2016). New Approaches to *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Gene Transfer to Plants. In Jamal F. (Ed.), *Genetic Engineering - An Insight into the Strategies and Applications*. IntechOpen, 23-45.
- Yin, J., Guan, X., Zhang, H., Wang, L., Li, H., Zhang, Q., Chen, T., Xu, Z., Hong, Z., Cao, Y., & Zhang, Z. (2019). An MAP kinase interacts with LHK1 and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Science China Life Sciences*, 62(9), 1203-1217. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9444-9>
- Yu, M., Yuan, M., & Ren, H. (2006). Visualization of actin cytoskeletal dynamics during the cell cycle in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow) cells. *Biology of the Cell*, 98(5), 295-306. <https://doi.org/10.1042/BC20050074>

- Yuan, G., Gao, H., & Yang, T. (2023). Exploring the Role of the Plant Actin Cytoskeleton: From Signaling to Cellular Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15480. <https://doi.org/10.3390/ijms242015480>
- Zepeda, I., Sánchez-López, R., Kunkel, J. G., Bañuelos, L. A., Hernández-Barrera, A., Sánchez, F., Quinto, C., & Cárdenas, L. (2014). Visualization of Highly Dynamic F-Actin Plus Ends in Growing *Phaseolus vulgaris* Root Hair Cells and Their Responses to *Rhizobium etli* Nod Factors. *Plant and Cell Physiology*, 55(3), 580-592. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct202>
- Zhang, M., & Zhang, S. (2022). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 301-341. <https://doi.org/10.1111/jipb.13215>
- Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., & Kong, Z. (2019). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 221(2), 1049-1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>
- Zhou, C., Han, L., Pislariu, C., Nakashima, J., Fu, C., Jiang, Q., Quan, L., Blancaflor, E. B., Tang, Y., Bouton, J. H., *et al.* (2011): From model to crop: functional analysis of a STAY-GREEN gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement. *Plant Physiology* 157, 1483-1496. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185140>
- Zhukov, V., Radutoiu, S., Madsen, L. H., Rychagova, T., Ovchinnikova, E., Borisov, A., Tikhonovich, I., & Stougaard, J. (2008). The Pea Sym37 Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1600-1608. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1600>
- Zupan, J. R., & Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiology*, 107(4), 1041-1047. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1041>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	2,4-dichlórfenoxyoctová kyselina
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>At</i>)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABD	aktín-viažuca doména
ABPs	aktín-viažuce proteíny
ACLSM	CLSM s použitím Airyscan modulu
ADFs	aktín-depolymerizujúce faktory
ADP	adenozíndifosfát
AFs	aktínové filamenty
ARP2/3	aktínový proteínový komplex 2/3
AtFiml	fimbrín 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenozíntrifosfát
AU	jednotka intenzity fluorescencie; jednotka priemeru apertúry pinhole („Airy unit“)
B50 médium	médium indukujúce tvorbu somatických embryí
B5H médium	médium indukujúce kalogenézu
Ca²⁺	vápenatý kation
CCAMK	proteínkináza závislá od Ca ²⁺ -kalmódulínu
CLSM	konfokálna laserová skenovacia mikroskopia
CNGC15	z angl. cyclic nucleotide-gated ion channel protein 15
CoA	koenzým A
CSSP	všeobecná symbiotická signálna dráha
DELLA	proteíny z rodiny transkripčných faktorov GRAS (D - kyselina asparágová, E - kyselina glutámová, L – leucín, L – leucín, A – alanín)
DMI1	iónový kanál (z angl. does not make infections protein 1)
DMI2	z angl. Does not make infections protein 2
DMI3	z angl. Does not make infections protein 3
EMCCD	z angl. „electron-multiplying charge-coupled device“
ENOD11	gén kódujúci proteín „Early nodulin-11“
ENOD12	gén kódujúci proteín „Early nodulin-12“

EPS	exopolysacharidy
ERN1	transkripčný faktor reagujúci na etylén ERN1
ERN2	transkripčný faktor reagujúci na etylén ERN1
Et-OH	etanol
F-aktín	aktínové mikrofilamenty fimbrínu 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFim1)
FITC	fluoresceín izotiokyanát
g·l⁻¹	gram na liter
g·ml⁻¹	gram na mililiter
G-aktín	globulárny aktín
GFP	zelený fluorescenčný proteín (z angl. green fluorescent protein)
GFP-FABD2	fúzní proteín - fúzia C-terminálneho konca GFP k N-terminálnemu
GRAS	z angl. GIBBERELIC ACID INSENSITIVE REPRESSOR OF ga1-3 SCARECROW
HMGR1	3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA reductáza 1
IPD3	DMI3-interagujúci proteín IPD3
ISR	indukovaná systémová rezistencia
IT	infekčné vlákno koncu aktín-viažucej domény 2 (z angl. actin binding domain 2) z
<i>L. japonicus</i>	<i>Lotus japonicus</i> (<i>Lj</i>)
LB médium	médium pre kultiváciu baktérií (z angl. Lysogeny broth)
LCOs	lipochitooligosacharidy
LjCASTOR	iónový kanál
LjCYCLOPS	proteín CYCLOPS
LjMPK6	mitogénom aktivovaná proteínkináza kináza 6
LjNPL	pektát lyáza
LjPOLLUX	iónový kanál
LjSIP2	MEK mitogénom aktivovaná proteínkináza kináza
LRR	repetica bohatá na leucín
LSFM	„Light-sheet“ fluorescenčná mikroskopia
LYK3	LysM receptoru-podobná kináza 3
LysM doména	z angl. lysin motif domain

LysM-RLKs	LysM receptoru-podobné kinázy (z angl. LysM receptor-like kinases)
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L ssp. (<i>Ms</i>)
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i> (<i>Mt</i>)
MAPK	mitogénom-aktivovaná proteínkináza
MAPKK	mitogénom-aktivovaná proteínkináza kináza
MAPKKK	mitogénom-aktivovaná proteínkináza kináza kináza
MAPKs	mitogénom-aktivované proteínkinázy
MCA8	vápniková ATP-áza typu IIA
mE·m⁻²·s⁻¹	hodnota svetelného toku; fotosynteticky aktívne žiarenie (spektrálny rozsah slnečného žiarenia je od 400 do 700 nm)
mg·l⁻¹	miligram na liter
mg·ml⁻¹	miligram na mililiter
min	minúta
ml	mililiter
ml·l⁻¹	mililiter na liter
mm	milimeter
MMS médium	médium indukujúce vývoj koreňov a výhonkov
mRFP	červený fluorescenčný proteín
MS médium	Murashige and Skoog médium
MtCRE1	z angl. Cytokinin Response 1 receptor
MtEXO70 H4	podjednotka EXO70 proteínového komplexu exocysty
MtFLOT2	Flotilínu-podobný proteín 2
MtFLOT4	Flotilínu-podobný proteín 4
MtLIN	z angl. putative E3 ubiquitin-protein ligase LIN
MtNF-YA1	podjednotka A-1 jadrového transkripčného faktora Y
MtPUB1	proteín obsahujúci doménu U-box
<i>MtRIP1</i>	gén u <i>Medicago truncatula</i> kódujúci peroxidázu
MtSYMREM1	symbiotický remorín 1
MtVPY	vapyrín
Na2EDTA	disodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej
NAA	1-naftyloctová kyselina

NENA	z angl. WD40 repeat nucleoporin similar to SEH1
NF receptor	receptory rozpoznávajúce Nod faktory
NF	Nod faktor
NFP	serín/treonínovému receptoru-podobná kináza NFP (alternatívny názov z angl. Nod factor preception protein)
NFR1	Nod faktor receptor 1
NFR5	Nod faktor receptor 5
NIF	gény zapojené v fixácii atmosférického dusíka
NIN	z angl. nodule inception protein
NIN	gén kódujúci transkripčný faktor NIN
NOD	nodulačné gény
Nod faktory	nodulačné faktory
NodD	nodulačný proteín D
NORK	receptorová kináza hľúzkovania
NPTII	gén kódujúci neomycín fosfotransferasu
NSP1	z angl. protein NODULATION SIGNALING PATHWAY 1
NSP2	z angl. protein NODULATION SIGNALING PATHWAY 2
NUP133	nukleoporínu 133 podobný nukleoporín (z angl. Nup133-like nucleoporin)
NUP85	nukleoporín 85 (z angl. nuclear pore complex protein Nup85)
Obr.	obrázok
OD600	optická hustota pri 600 nm
<i>P. sativum</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
PALM	fotoaktivačná lokalizačná mikroskopia
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových kationov
<i>R. etli</i>	<i>Rhizobium etli</i>
RLK	receptoru podobná kináza
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
rpm	otáčky za minútu
RSY	<i>M. sativa</i> L . divoký typ, kultivar Regen SY
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>

sCMOS	z angl. „scientific Complementary Metal Oxide Semiconductors“
SIM	mikroskopia so štruktúrovaným osvetlením
SIMK	soľným stresom indukovaná mitogénom aktivovaná proteínináza
SIMKK	soľným stresom indukovaná mitogénom aktivovaná proteínináza kináza
ssp.	poddruh
STED	mikroskopia so stimulovanou redukciou fluorescenčnej emisie
STORM	stochastická optická rekonštrukčná mikroskopia
SYM10	proteín rozpoznávajúci Nod faktor
SYM37	z angl. nodule inception protein
SymRK	kináza podobná-receptoru symbiózy
SyPME1	pektinesteráza 1
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
TIC	tikarcilín
t-SNAREs	cieľové transportné proteíny SNARE (SNAP receptor)
<i>V. sativa</i>	<i>Vicia sativa</i>
v-SNAREs	vezikulárne transportné proteíny SNARE (SNAP receptor)
w/v	hmotnosť na objem
μl	mikroliter
μl·l⁻¹	mikroliter na liter
μm	mikrometer

9 PRÍLOHY

Video 1. Časozberné snímanie aktínového cytoskeletu okolo jadra v koreňovom vlásku u línie GFP-FABD2, 7 dní po aplikácii *S. meliloti* z obrázku 17. Mierka = 10 μm .

Video 2. Časozberné snímanie aktínového cytoskeletu okolo rastúceho infekčného vlákna v koreňovom vlásku u línie GFP-FABD2, 10 dní po aplikácii *S. meliloti* z obrázku 21F. Mierka = 10 μm .

Video 3. Časozberné snímanie aktínového cytoskeletu okolo rastúceho infekčného vlákna v koreňovom vlásku u línie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, 10 dní po aplikácii *S. meliloti* z obrázku 22D. Mierka = 10 μm .

Video 4. Ortogonálna projekcia infikovanej bunky v koreňovej hlúžke u línie GFP-FABD2 v pohľade X-Y z obrázku 35A. Mierka = 5 μm .

Video 5. Ortogonálna projekcia infikovanej bunky v koreňovej hlúžke u línie GFP-FABD2 v pohľade X-Y z obrázku 35B. Mierka = 5 μm .

Video 6. Ortogonálna projekcia infikovanej bunky v koreňovej hlúžke u línie GFP-FABD2 v pohľade X-Y z obrázku 35C. Mierka = 10 μm .